

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Microbiología I**



**FACTORES GENÉTICOS DE SUSCEPTIBILIDAD A LA  
ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL EN LA  
POBLACIÓN ESPAÑOLA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Ana María Márquez Ortiz**

Bajo la dirección de los doctores  
Elena Urcelay  
Alfonso Martínez

**Madrid, 2011**

**ISBN: 978-84-694-9535-3**

**©Ana María Márquez Ortiz, 2011**

# TESIS DOCTORAL

## **Factores genéticos de susceptibilidad a la enfermedad inflamatoria intestinal en la población española**

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I



Memoria presentada por **Ana M<sup>a</sup> Márquez Ortiz** para optar al grado de Doctor  
bajo la dirección de los Doctores Elena Urcelay y Alfonso Martínez.

Madrid, 2011







## AGRADECIMIENTOS

---



Este trabajo se ha llevado a cabo gracias a la financiación obtenida de los siguientes proyectos: FIS PI081676, Fundación Mutua Madrileña y Fundación Ramón Areces.

Además del soporte económico, la realización de este trabajo ha sido posible gracias al apoyo de gran cantidad de personas que con su profesionalidad y cariño me han ayudado a superarme día a día.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de Tesis, Elena Urcelay y Alfonso Martínez, su gran dedicación y esfuerzo. Gracias Elena por estar siempre disponible cuando lo he necesitado, por dejarme tomar decisiones. Gracias Alfonso por hacerme ver más allá, por incentivarme y ayudarme a disfrutar con mi trabajo.

Me gustaría dar las gracias también al Dr. Emilio Gómez de la Concha por brindarme la oportunidad de asomarme al mundo de la investigación y de conocer a personas maravillosas que me han dado apoyo en todos los sentidos. Gracias a M<sup>a</sup> Ángeles Figueredo, Menchu, Carmen Poyo, Pepa, Pilar, Toñi, Amparo, Ángeles, Miguel Fernández-Arquero, José Luis Santiago, Ángel García y, en especial, a Carmen Martínez por su apoyo profesional y personal, por valorar mi trabajo, ayudarme a madurar y darme confianza en mí misma.

Muchas gracias a Nadia, Laura, Nieves, María, Gorka, Carlos, Ana y Arturo por los momentos que hemos compartido durante estos años. A Conchita un agradecimiento especial por ayudarme en todo momento, aún sin tener obligación, por orientarme y aconsejarme cuando lo he necesitado, por ser mi amiga.

Mamencita, Puyito y Winnie no tengo palabras. No podía imaginarme que iba a conocer a personas tan especiales, volvería a pasar otra vez por los malos momentos si el resultado volviera a ser el mismo, disfrutar de vuestra amistad y cariño.

A Raúl y Rocío que me han servido de apoyo en la recta final de mi trabajo. Me alegro de que nos hayamos reencontrado.





## *Agradecimientos*

---

*A mi familia que me ayuda y me protege,  
con la que siempre puedo contar...*



## ÍNDICE

---



ABREVIATURAS .....	5
1. INTRODUCCIÓN .....	9
1.1 Definición y epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal .....	11
1.2 Características clínicas de la enfermedad inflamatoria intestinal .....	11
1.3 Componentes del sistema inmune intestinal.....	14
1.3.1 Epitelio intestinal.....	14
1.3.2 Tejido linfoide asociado al intestino.....	15
1.4 Homeostasis intestinal.....	17
1.5 Patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal.....	20
1.5.1 Pérdida de la homeostasis intestinal .....	20
1.5.2 Factores ambientales en la enfermedad inflamatoria intestinal .....	23
1.5.3 Factores genéticos en la enfermedad inflamatoria intestinal .....	23
1.6 Genética de la enfermedad inflamatoria intestinal .....	24
1.6.1 Estudios de ligamiento.....	25
1.6.2 Estudios de asociación de genes candidatos.....	26
1.6.3 Estudios de asociación mediante barrido genómico .....	30
1.7 Genes estudiados.....	36
2. OBJETIVOS .....	55
3. PACIENTES Y MÉTODOS .....	59
3.1 Muestras analizadas.....	61
3.2 Métodos empleados en el análisis .....	62
3.2.1 Aislamiento de ADN a partir de sangre periférica .....	62
3.2.2 Cuantificación del ADN y estimación de su pureza.....	63
3.2.3 Tipaje de HLA de clase II.....	64
3.2.4 Tipaje de polimorfismos en genes candidatos .....	64
3.2.5 Estudios realizados y análisis estadístico .....	71
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	77

4.1	Genes que codifican receptores de patrones moleculares asociados a patógenos: <i>IFIH1</i> y <i>CLEC16A</i> .....	79
4.2	Genes implicados en autofagia: <i>IRGM</i> y <i>ATG16L1</i> .....	85
4.3	Genes que codifican citoquinas y receptores de citoquinas: <i>MST1</i> , <i>IL2</i> , <i>IL2RA</i> , <i>IL2RB</i> , <i>IL23R</i> e <i>IL12B</i> .....	90
4.4	Genes que codifican factores de transcripción: <i>NKX2-3</i> , <i>PXR</i> , <i>STAT4</i> y <i>STAT3</i> ....	105
5.	CONCLUSIONES .....	121
6.	PERSPECTIVAS .....	125
7.	REFERENCIAS .....	129
8.	ANEXO: publicaciones derivadas de este trabajo.....	151

## **ABREVIATURAS**

---





---

AR	Artritis reumatoide
ATG16L1	"Autophagy related 16-like 1"
CARD	"Caspase-recruitment domain"
CD	Célula dendrítica
CLEC16A	"C-type lectin domain family 16, member A"
CNV	"Copy number variation"
CU	Colitis ulcerosa
DL	Desequilibrio de ligamiento
DT1	Diabetes tipo 1
EC	Enfermedad de Crohn
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
GALT	"Gut associated lymphoid tissue", tejido linfoide asociado al intestino
GWAS	"Genome-wide association study", estudio de barrido genómico
HLA	"Human leukocyte antigen", antígeno leucocitario humano
IBD	"Inflammatory bowel disease"
IFIH1	"Interferon induced with helicase C domain 1"
IFN	Interferón
IgA	Inmunoglobulina A
I $\kappa$ B	"Inhibitor of NF- $\kappa$ B"
IL	Interleuquina
IRF	"Interferon regulatory factor"
IRGM	"Immunity-related GTPase family, M"
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	"Mitogen-activated protein kinase"
MDP	Muramil dipéptido
MDR1	"Multidrug resistance protein 1"
MST1	"Macrophage stimulating 1"
MST1R	"Macrophage stimulating 1 receptor"
NF- $\kappa$ B	"Nuclear factor $\kappa$ B"
NK	"Natural killer"
NKX2-3	"NK2 transcription factor related, locus 3"
NLR	"NOD-like receptor"
NOD	"Nucleotide-binding oligomerization domain"

OCTN	"Organic cation transporter"
OR	"Odds ratio"
PAMPs	"Pathogen-associated molecular patterns"
PCR	"Polymerase chain reaction", reacción en cadena de la polimerasa
PGE2	Prostaglandina E2
PPAR- $\gamma$	"Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ "
PRR	"Pattern-recognition receptor"
PXR	"Pregnane X receptor"
SIGIRR	"Single immunoglobulin-1R-related molecule"
SLC22A4/5	"Solute carrier family 22, member 4/5"
SNP	"Single nucleotide polymorphism", polimorfismo de un solo nucleótido
SOCS	"Suppressor of cytokine signaling 3"
STAT	"Signal transducer and activator of transcription"
TCR	"T cell receptor"
TGF- $\beta$	"Transforming growth factor $\beta$ "
Th	"T helper"
TLR	"Toll-like receptor"
TNF	"Tumor necrosis factor", factor de necrosis tumoral
Treg	T reguladora
TSLP	"Thymic stromal lymphopoietin", linfopoyetina estromal tímica

## 1. INTRODUCCIÓN

---



## **1.1 Definición y epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal**

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una inflamación crónica del tracto gastrointestinal de etiología desconocida. Se clasifica en dos formas, enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU), que se consideran enfermedades diferentes pero se engloban bajo una misma denominación porque comparten características clínicas, factores genéticos y aspectos inmunológicos.

La EII es más frecuente en latitudes septentrionales, presentando su tasa más alta en el norte de Europa, Reino Unido y Norteamérica, aunque también puede aparecer en otras áreas tales como África, Latinoamérica y Asia. En España la tasa de incidencia estaría en torno a  $3.8/10^5$  habitantes/año en colitis ulcerosa y  $1.9/10^5$  habitantes/año en enfermedad de Crohn (1). Esta patología puede presentarse a cualquier edad aunque se diagnostica con más frecuencia en la segunda o tercera década de la vida. En el caso de la CU no se han encontrado diferencias en cuanto a la incidencia entre hombres y mujeres. Sin embargo, la incidencia de la enfermedad de Crohn parece ser algo mayor en mujeres que en hombres, aunque esta depende de la edad y la localización geográfica (2).

## **1.2 Características clínicas de la enfermedad inflamatoria intestinal**

La colitis ulcerosa se origina como una inflamación en el recto que gradualmente se extiende hacia el colon (3, 4). Aproximadamente en la mitad de los casos permanece distal, pero en más del 20% de ellos termina afectándose completamente el intestino grueso. En el caso de que la inflamación afecte a todo el intestino grueso la enfermedad es más severa y conlleva un aumento del riesgo de padecer carcinoma colónico. Histológicamente, la colitis ulcerosa se caracteriza por la aparición de hemorragia, edema, regeneración epitelial y, fundamentalmente, por la formación de úlceras en la mucosa, lo que lleva gradualmente a la pérdida de la función absorbente de esta capa. En cuanto a la clínica destaca el dolor abdominal, defecación dolorosa, diarrea sanguinolenta con urgencia y tenesmo, pérdida de peso y fiebre.

Actualmente se utiliza la clasificación de Montreal (5) que divide esta patología basándose en dos criterios, la extensión de la inflamación y la gravedad.

Tabla 1. Clasificación de Montreal de la colitis ulcerosa.

Extensión (E)
<b>E1:</b> Proctitis ulcerosa (afección limitada al recto, el límite superior de la inflamación no supera la unión rectosigmoidea)
<b>E2:</b> Colitis izquierda o distal (afección limitada al colon izquierdo, el límite superior de la inflamación no supera el ángulo esplénico)
<b>E3:</b> Colitis extensa o pancolitis (afección que se extiende más allá del ángulo esplénico)
Gravedad (S)
<b>S0:</b> Colitis en remisión o colitis silente
<b>S1:</b> Colitis leve
<b>S2:</b> Colitis moderada
<b>S3:</b> Colitis grave

---

En contraste, la enfermedad de Crohn puede involucrar a cualquier parte del tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano, pudiendo verse afectados múltiples sitios del intestino de un mismo individuo, aunque aparece con más frecuencia en el íleon terminal (2/3 de los pacientes) (3, 4). Consiste en una inflamación que afecta a todas las capas del intestino con lesiones granulomatosas que, a diferencia de la CU, son discontinuas con presencia de segmentos de intestino normal entre regiones afectadas, y llevan a síntomas obstructivos, formación de abscesos y fístulas, pudiendo aparecer también úlceras. El intestino delgado está afectado en el 90% de los casos, sobre todo el íleon terminal. En más del 50% de los enfermos hay afectación ileocolónica y en el 10% de los casos, afectación colónica exclusivamente. Existe afectación anal y perianal en más del 40% de los casos, y el esófago, estómago y duodeno están afectados en un 30% de los pacientes. La clasificación de Montreal divide esta patología en base a tres criterios, la edad de diagnóstico, la localización de la inflamación y el comportamiento de la misma.

Tabla 2. Clasificación de Montreal de la enfermedad de Crohn.

Edad de diagnóstico (A)	
A1: ≤ 16 años	
A2: 17 - 40 años	
A3: > 40 años	
Localización (L)	
L1: íleon terminal	L1+L4: íleon terminal + tracto digestivo superior
L2: colon	L2+L4: colon + tracto digestivo superior
L3: ileocólica	L3+L4: ileocólica + tracto digestivo superior
L4: tracto digestivo superior	
Comportamiento (B)	
B1: inflamatorio puro	B1p: inflamatorio con afección perianal asociada
B2: estenosante	B2p: estenosante con afección perianal asociada
B3: fistulizante	B3p: fistulizante con afección perianal asociada

La combinación de localización y comportamiento de la enfermedad a menudo determina la presentación clínica. En ocasiones, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa pueden ser indistinguibles, particularmente cuando la primera se limita al intestino grueso y la inflamación no se asocia con granulomas (colitis indeterminada). El curso clínico se caracteriza por dolor abdominal severo, diarrea, pérdida de peso y retraso en el desarrollo.

En la enfermedad de Crohn las lesiones conllevan la acumulación de linfocitos y células plasmáticas junto a las criptas de la mucosa, seguida por la llegada de macrófagos que finalmente asumen la apariencia de células epitelioides dando lugar a la formación de granulomas. Si las células se acumulan en el fondo de la cripta se forman abscesos mientras que si lo hacen en la parte alta se forman úlceras. La acumulación de estas últimas en varias criptas adyacentes da lugar a la formación de “úlceras aftosas” que es considerada la evidencia macroscópica más temprana de EC. Por lo tanto, la enfermedad comienza como un proceso inflamatorio “de novo” que resulta finalmente en el daño de las células epiteliales y la inflamación de las capas más profundas de tejido. En el caso de la colitis ulcerosa, la infiltración se produce de manera más difusa y desorganizada.

En ambas patologías es frecuente la aparición de manifestaciones extraintestinales principalmente articulares como artralgia y artritis, mucocutáneas, fundamentalmente eritema nodoso, y oculares, principalmente uveítis.



## 1.3 Componentes del sistema inmune intestinal

La mucosa intestinal representa un importante sitio de entrada de microbios, por lo cual necesita un sistema inmune innato y adaptativo que le permita defenderse frente a la invasión de microorganismos potencialmente patógenos (6-8).

### 1.3.1 *Epitelio intestinal*

El epitelio intestinal constituye la primera barrera de defensa frente a la entrada de antígenos orales, por lo que presenta numerosas adaptaciones físicas cuya finalidad es separar el tejido conectivo del medio externo. Así, las células epiteliales intestinales presentan uniones intercelulares estrechas (“tight junctions”) que impiden la difusión de moléculas entre el lumen apical y el espacio basolateral, impidiendo la entrada de microorganismos. En esta capa encontramos también células epiteliales especializadas con distintas funciones:

- **Células caliciformes:** refuerzan esta barrera física mediante la producción de una sustancia denominada mucus rica en proteínas glicosiladas (mucinas) que forma una capa viscosa y relativamente impermeable en la superficie apical del epitelio.
- **Células de Paneth:** localizadas en la base de las criptas del intestino delgado, secretan péptidos antimicrobianos muy potentes denominados defensinas.
- **Células M (Microfold):** se encuentran recubriendo las placas de Peyer y se encargan de transferir antígenos a las mismas.

Además, las células epiteliales expresan algunos de los llamados receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), es decir, estructuras altamente conservadas presentes exclusivamente en los patógenos microbianos, como lipopolisacárido (LPS), peptidoglicano o flagelina, entre otros. Estos receptores son principalmente de tipo Toll (TLRs) y de tipo NOD (NLRs) y su expresión sugiere que las células epiteliales intestinales, además de su función como barrera física,

podrían influir en el inicio y la regulación de la respuesta inmune antimicrobiana.

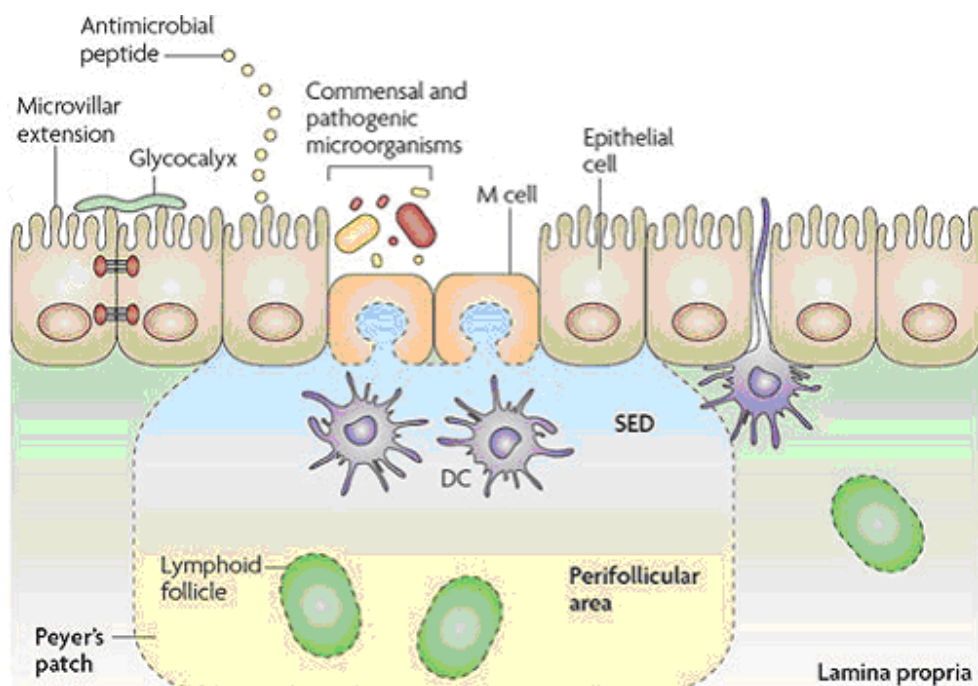
### **1.3.2 Tejido linfoide asociado al intestino**

El tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal se conoce como GALT ("Gut Associated Lymphoid Tissue") y está constituido por las placas de Peyer (intestino delgado), folículos linfoides aislados (intestino delgado y grueso), ganglios linfáticos mesentéricos, linfocitos de la lámina propia y linfocitos intraepiteliales. Desde el punto de vista funcional, los tres primeros constituyen el compartimento inductor que es donde tiene lugar la captura de los antígenos del lumen y la inducción de la respuesta inmune, mientras que los linfocitos intraepiteliales y los de la lámina propia constituyen el compartimento efector, es decir, aquel donde las células inmunes se diferencian y ejercen su función.

- **Ganglios linfáticos mesentéricos:** al igual que el resto de ganglios linfáticos, presentan una capa externa, formada por la corteza y la paracorteza, y una capa interna denominada médula. La corteza está constituida por folículos formados por linfocitos B (folículos primarios), algunos de los cuales incluyen centros germinales donde encontramos linfocitos B en proliferación (folículos secundarios). Alrededor de estos folículos se localiza la paracorteza que es un área rica en linfocitos T y células dendríticas (CD). La médula está formada principalmente por macrófagos y células plasmáticas.
- **Placas de Peyer y folículos linfoides aislados:** las placas de Peyer están formadas por agregados de linfocitos B (folículos linfoides) rodeados por áreas ricas en células T y células presentadoras de antígeno como macrófagos y células dendríticas. Recubriendo las placas de Peyer encontramos a las células M que tienen la capacidad de capturar material del compartimento luminal como antígenos solubles, células epiteliales apoptóticas y bacterias, y transportarlo a las placas de Peyer para que sea procesado por las células dendríticas o destruido por los macrófagos. De forma similar, los folículos linfoides aislados contienen células B, células dendríticas y células M localizadas en el epitelio asociado al folículo adyacente.
- **Linfocitos intraepiteliales:** son principalmente linfocitos T CD8. En la mayoría de ellos el receptor de antígeno de los linfocitos T (TCR) es  $\alpha\beta$ , sólo el 10% son  $\gamma\delta$ , con muy poca diversidad, quizá debido a que está involucrado en el

reconocimiento de los antígenos que se encuentran comúnmente en el lumen intestinal. Estas células son retenidas en la capa epitelial a través de la expresión de la integrina  $\alpha_E(\text{CD}103)\beta_7$  que se une a la cadherina E expresada en la superficie basolateral de las células epiteliales intestinales, de manera que existe una estrecha comunicación entre estas células. Estos linfocitos se encargan de monitorizar el daño epitelial.

- **Linfocitos de la lámina propia:** son principalmente linfocitos T CD4+ con fenotipo activado ya que éste es un lugar principalmente efector. También encontramos en esta zona células plasmáticas productoras de Inmunoglobulina A (IgA), macrófagos y células dendríticas.



**Figura 1.** Componentes del sistema inmune de la mucosa intestinal (figura obtenida de Artis et al (6)).  
DC, "dendritic cell"; SED, "subepithelial dome".

Las células dendríticas que han captado el antígeno transferido por las células M, migran a las áreas de células T de las placas de Peyer y se lo presentan a los linfocitos T “naive”, los cuales se activan y se diferencian en células efectoras y reguladoras. Estas células dendríticas pueden migrar también a los nódulos linfoides mesentéricos, ya que estos están conectados a las placas de Peyer y la mucosa intestinal. Los linfocitos activados pasan a la circulación a través de los vasos linfáticos eferentes para, posteriormente, volver a la lámina propia intestinal, por eso, como se mencionó anteriormente, en esta zona encontramos fundamentalmente células T activadas. Algunas células dendríticas localizadas en la lámina propia son capaces de comprobar el contenido del lumen intestinal porque forman uniones similares a las “tight junctions” con las células epiteliales intestinales y proyectan sus dendritas a través del epitelio. A continuación migran a los ganglios linfáticos mesentéricos a través del sistema linfático y presentan los antígenos a las células T. La presencia de bacterias patógenas induce el reclutamiento de gran cantidad de células dendríticas.

## **1.4 Homeostasis intestinal**

Como se ha mencionado anteriormente, la mucosa intestinal es un sitio importante de entrada de microorganismos, pero también se encuentra constantemente en contacto con bacterias comensales y antígenos de la comida. Por tanto, debe existir un balance entre la necesidad de responder a patógenos y la coexistencia con la flora comensal. El proceso que permite establecer una homeostasis, de manera que la respuesta a la flora intestinal sea autolimitada y no resulte en inflamación, se conoce como tolerancia oral.

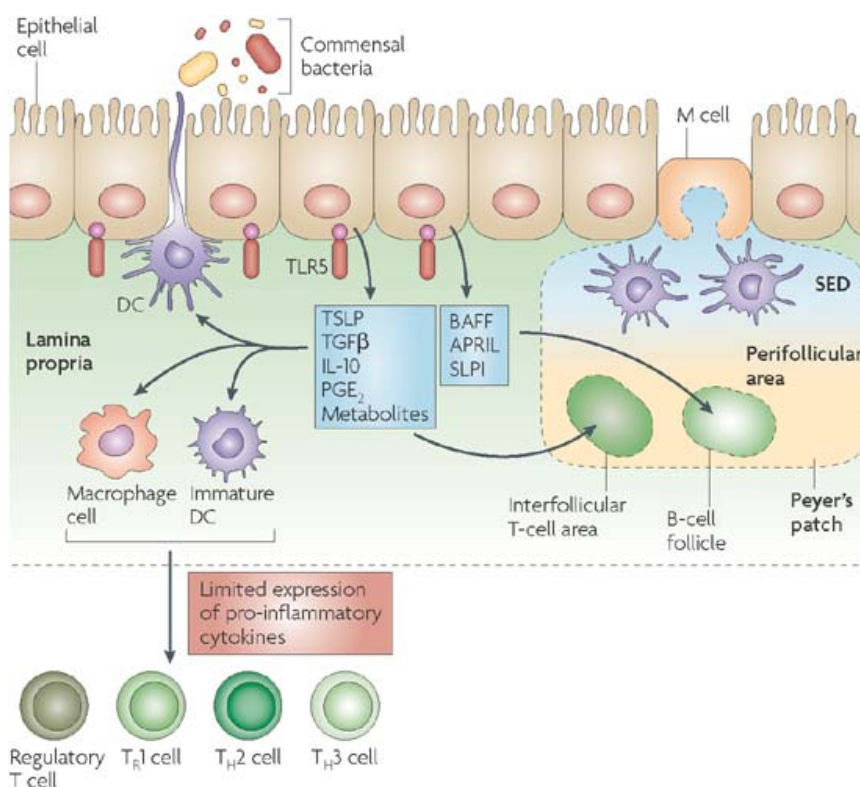
Parecen existir dos mecanismos principales de tolerancia oral, la inducción de células T reguladoras y la inducción de anergia o delección clonal. El factor principal que determina la forma de tolerancia periférica que se va a desarrollar es la dosis de antígeno, aunque ambas formas no son mutuamente excluyentes. Las bajas dosis de antígeno resultan en la generación de células reguladoras específicas de antígeno mientras que dosis altas resultan en la anergia/delección de células T específicas (9).

El mecanismo que permite a las células epiteliales discriminar entre patógenos y bacterias comensales aún no se ha esclarecido. Inicialmente se propuso que los TLRs se expresaban exclusivamente en la membrana basolateral de las células epiteliales o intracelularmente, de manera que la membrana apical no era capaz de interactuar con las

bacterias comensales y además éstas carecen de los factores de virulencia necesarios para atravesar el epitelio. Posteriormente, varios estudios han demostrado que esto no parecer ser cierto ya que se ha visto, “in vivo” e “in vitro”, que TLR9 se expresa en la superficie de las células epiteliales tanto apical como basolateralmente (10). Estos estudios proponen que la unión de TLR9 a su ligando en la superficie apical induce una activación parcial del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (“nuclear factor  $\kappa$ B”), un importante regulador de la respuesta inflamatoria, y no se estimula la liberación de citoquinas proinflamatorias. Por el contrario, cuando la unión tiene lugar basolateralmente, se induce una respuesta inflamatoria potente. Por otro lado, se ha encontrado que las bacterias comensales inducen señales inhibitorias en las células epiteliales que, entre otras cosas, parecen reducir la activación y la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B a través de la estabilización de su inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$  (“inhibitor of NF- $\kappa$ B alpha”) (11). Sea de un modo u otro, en presencia de bacterias comensales, las células epiteliales producen, de manera constitutiva, moléculas como TGF- $\beta$  (“transforming growth factor  $\beta$ ”), TSLP (“thymic stromal lymphopoietin”, linfopoyetina estromal tímica) y PGE2 (prostaglandina E2), que mantienen a los macrófagos y células dendríticas en un estado quiescente, expresando bajos niveles de moléculas coestimuladoras (6). Cuando estas células dendríticas presentan antígenos a las células T CD4 “naive”, éstas se diferencian preferentemente a células T reguladoras que suprimen la respuesta inmune inhibiendo la generación de células efectoras y liberando citoquinas anti-inflamatorias, principalmente TGF- $\beta$  e IL-10 (interleuquina-10). IL-10 suprime directamente la respuesta de los linfocitos T, reduciendo su producción de IL-2, TNF- $\alpha$  (“tumor necrosis factor alpha”, factor de necrosis tumoral alfa) e IL-5, e indirectamente inhibiendo la presentación de antígenos por disminución de la expresión de moléculas HLA (“human leukocyte antigen”, antígeno leucocitario humano) y moléculas coestimuladoras en células presentadoras. El TGF- $\beta$  bloquea la producción de citoquinas por las células T y la división celular. Los macrófagos intestinales actúan de forma similar a las células dendríticas; así recientemente se ha propuesto que, al igual que éstas, son capaces de favorecer la inducción de células T reguladoras. Sin embargo, la función de estos macrófagos tolerogénicos no está muy clara, por ejemplo aún no se conoce si son capaces de migrar a los nódulos linfáticos mesentéricos, lo cual parece ser necesario para la inducción de tolerancia oral. Se ha propuesto que su función sería apoyar localmente el mantenimiento de un fenotipo T regulador en un ambiente continuamente expuesto a bacterias y productos bacterianos.

En cuanto a los otros mecanismos de tolerancia oral, la anergia clonal se induce cuando los linfocitos T reconocen antígenos presentados por células presentadoras con una

expresión deficiente de moléculas coestimuladoras. Estos linfocitos sobreviven pero son incapaces de responder más tarde a antígenos presentados por células presentadoras competentes. La delección clonal, en este contexto, consiste en la muerte por apoptosis de linfocitos T sometidos a estímulos repetidos por antígenos persistentes (9).



**Figura 2.** Mecanismo de homeostasis intestinal (figura obtenida de Artis et al (6)).

APRIL, "a proliferation-inducing ligand"; BAFF, "B-cell-activating factor"; DC, "dendritic cell"; IL-10, "interleukin-10"; PGE<sub>2</sub>, "prostaglandin E<sub>2</sub>"; SED, "subepithelial dome"; SLPI, "secretory leukocyte peptidase inhibitor" TGFβ, "transforming growth factor-β"; TLR5, "toll-like receptor 5"; TSLP, "thymic stromal lymphopoietin".

## 1.5 Patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal

### 1.5.1 *Pérdida de la homeostasis intestinal*

Se cree que la enfermedad inflamatoria intestinal resultaría de una ruptura de esta tolerancia frente a la flora comensal, produciéndose una respuesta inmune inapropiada y exagerada a los constituyentes normales de la microflora. Este proceso parece estar conducido por las propias bacterias comensales que residen en el lumen intestinal ya que se ha observado que varios modelos murinos de EII no desarrollan colitis en un ambiente libre de gérmenes (12). Sin embargo, esta implicación de las bacterias en la patología podría ser indirecta, ya que la enfermedad podría deberse al papel que desempeñan los microorganismos en la maduración del propio sistema inmune (13) y sería, por tanto, origen indirecto de la enfermedad. En diversos estudios llevados a cabo en líneas celulares, modelos animales y pacientes de Crohn y colitis, se han encontrado defectos en el sistema inmune intestinal que podrían ser los responsables de esta pérdida de la homeostasis intestinal. Estos defectos podrían ser clasificados en tres categorías:

#### ❑ Defectos en la barrera epitelial

Las deficiencias en el epitelio permitirían que el sistema inmune intestinal quedara expuesto al contenido luminal, resultando en la producción de citoquinas inflamatorias. Así, en modelos animales se ha visto que defectos en la permeabilidad intestinal pueden causar enfermedad inflamatoria intestinal. Por ejemplo, ratones que expresan transgénicamente una proteína N-cadherina mutante desarrollan inflamación intestinal y displasia (14). Por otro lado, varios estudios han mostrado que la mucosa de los enfermos de Crohn y colitis presenta una disminución de la resistencia epitelial, un aumento de la permeabilidad intestinal y una producción de mucus alterada (15, 16).

#### ❑ Defectos del sistema inmune innato

La detección de microorganismos a través de los receptores de reconocimiento de patrón permite el desarrollo de células T reguladoras en el intestino y la supresión de inflamación crónica en respuesta a las bacterias comensales, en contraste con la fuerte respuesta inmune que se produce en respuesta a patógenos. Por lo tanto, defectos en esta distinción entre patógenos y organismos comensales pueden influir en la desregulación

observada en la enfermedad inflamatoria intestinal.

- **Receptores tipo Toll:** En los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, las células epiteliales de la mucosa presentan un patrón de expresión de TLRs diferente. La expresión de TLR3 se encuentra significativamente disminuida en la enfermedad de Crohn activa, pero no en colitis ulcerosa. Por el contrario, la expresión de TLR4 aparece muy aumentada en ambas enfermedades (17). Además, se ha encontrado que la expresión de dos moduladores negativos de la señalización de estos receptores, SIGIRR (“single immunoglobulin-1R-related molecule”) y PPAR- $\gamma$  (“peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ”), influye en la EII, concretamente, en ratones deficientes en SIGIRR se produce un aumento de la inflamación intestinal (18) mientras que la expresión de PPAR- $\gamma$  se encuentra disminuida en pacientes de CU (19).
- **Receptores tipo NOD:** la principal proteína NOD (“nucleotide-binding oligomerization domain”) que ha sido implicada en la enfermedad inflamatoria intestinal, concretamente en la enfermedad de Crohn, es NOD2. NOD2 es expresada por monocitos, macrófagos, células T y B, células dendríticas, células de Paneth y células epiteliales intestinales. Esta proteína reconoce el muramil dipéptido (MDP), un derivado del peptidoglicano de la pared bacteriana. La principal evidencia de que esta proteína tiene un papel en la patología, es el hallazgo de tres mutaciones en el gen que codifica este receptor, asociadas a la enfermedad de Crohn, siendo el gen *NOD2* el principal factor de susceptibilidad para esta enfermedad (20, 21). Diversos estudios llevados a cabo, tanto en líneas celulares como en modelos animales, han corroborado esta idea, sin embargo existen datos controvertidos en cuanto al papel exacto que tienen estas mutaciones en la patogenia de la enfermedad de Crohn. Este tema será tratado en profundidad más adelante.

□ Defectos del sistema inmune adaptativo

Existen numerosos artículos que apoyan el papel de la respuesta inmune adaptativa en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal. Inicialmente, los estudios se centraron en las células T efectoras pero más recientemente la investigación se ha enfocado en las células presentadoras y los linfocitos T reguladores.



- **Defectos en células presentadoras:** en los pacientes con EII, el reconocimiento y procesamiento de antígenos por las células presentadoras se encuentra alterado. Estudios con modelos animales e “in vitro” han mostrado que las células dendríticas reconocen de forma incorrecta a las bacterias comensales induciendo una respuesta inmune proinflamatoria. Esto podría deberse a una respuesta exagerada o disfuncional por parte de los receptores de tipo Toll. Por ejemplo, en la enfermedad inflamatoria intestinal se ha observado que las células dendríticas presentan una mayor expresión de TLR4 (22). Además, las células dendríticas humanas de pacientes de EII muestran una ausencia de su capacidad reguladora, lo que puede contribuir a una activación repetida de ciertas células T memoria o al fallo en la eliminación de los linfocitos T autorreactivos.
- **Defectos en el balance entre células reguladoras y efectoras:** en la enfermedad inflamatoria intestinal existe un predominio de las células T efectoras sobre las reguladoras. En la enfermedad de Crohn los linfocitos T naive se diferencian preferentemente a células Th1 (“T helper 1”). Estas células producen citoquinas inflamatorias tales como IL-12 e IFN- $\gamma$  (interferón gamma) que a su vez estimulan a los macrófagos para liberar IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ . En la colitis ulcerosa se encuentra incrementado el número de células NKT (“T natural killer”) activadas lo que lleva a un aumento de la secreción de IL-5 e IL-13 (23). Más recientemente se ha descrito un tercer tipo de células efectoras conocidas como células Th17 (“T helper 17”) que se caracterizan por la producción de IL-6 e IL-17 y cuyo desarrollo es promovido por IL-23. IL-23 es una citoquina heterodimérica formada por las subunidades p19 y p40, ésta última la comparte con IL-12 que además está formada por la subunidad p35. En un estudio utilizando ratones dobles deficientes IL-10/IL-23p19 e IL-10/IL-12p35 se demostró que IL-23, pero no IL-12 como se había supuesto con anterioridad, es esencial para el desarrollo de inflamación intestinal en este modelo de colitis “knockout” para IL-10, otorgando a las células Th17 un papel fundamental en la patología de la enfermedad de Crohn (24).
- **Defectos en células T reguladoras:** existen numerosos modelos animales en los que la enfermedad inflamatoria intestinal se debe a un defecto en las células T reguladoras. Por ejemplo, modelos murinos en los que existe una deficiencia en la

producción o función de una citoquina reguladora conocida, por ejemplo ratones “knockout” para IL-10 (25), presentan inflamación intestinal. Por otro lado, estudios llevados a cabo con pacientes de Crohn y colitis demuestran que existe un defecto en la generación de células T reguladoras “in vivo” (26, 27).

### **1.5.2 Factores ambientales en la enfermedad inflamatoria intestinal**

La enfermedad inflamatoria intestinal es una “enfermedad de civilización”, es decir, ocurre con más frecuencia en los países desarrollados, lo cual sugiere que deben estar implicados factores ambientales que se asocian no sólo con el desarrollo de la patología, sino también con su perpetuación. La “hipótesis de la higiene” propone que la falta de estimulación del sistema inmune por bacterias durante la infancia puede predisponer a padecer enfermedad inflamatoria intestinal (28). Muchos factores ambientales han sido implicados en esta patología como por ejemplo el tabaco, la apendicectomía, la toma de anticonceptivos orales y antiinflamatorios no esteroideos, la dieta, la profesión, el estatus social, las variaciones estacionales o los agentes infecciosos. Sin embargo, los dos primeros son los que están más establecidos. Numerosos estudios han confirmado que existe una relación inversa entre la aparición de colitis ulcerosa y fumar tabaco. En contraste con la CU, varios artículos han descrito que fumar es un factor de riesgo para la enfermedad de Crohn. Aunque el mecanismo de acción aún no se conoce, parece que fumar influiría no sólo en el desarrollo de estas patologías sino también en su curso clínico. De la misma manera, la apendicectomía parece ser un factor de protección frente al desarrollo de colitis, mientras que aumenta el riesgo de padecer enfermedad de Crohn (29).

### **1.5.3 Factores genéticos en la enfermedad inflamatoria intestinal**

Los estudios en gemelos y familias han puesto de manifiesto que la genética juega un papel importante en la patogénesis de la EII (30).

Los primeros constituyen una herramienta importante para determinar la contribución relativa de la herencia y de los factores ambientales a la etiología de la enfermedad de Crohn y de la colitis ulcerosa. De manera que en una enfermedad que fuera enteramente debida a factores genéticos, la concordancia en gemelos idénticos (monozigóticos) sería del 100%, y entre gemelos no idénticos (dizigóticos) del 14% en el caso de una enfermedad recesiva, como lo son la mayoría. Mientras que si una patología se debiera exclusivamente a factores

extrínsecos o adquiridos, la concordancia sería similar en ambos tipos de gemelos.

En varios estudios se ha observado que la tasa de concordancia para la enfermedad de Crohn en gemelos monozigóticos es de entre el 20% y el 50%, mientras que en dizigóticos criados en el mismo ambiente es inferior al 10%. El análisis de las características fenotípicas en una cohorte sueca ha proporcionado evidencias de que el fenotipo de la enfermedad de Crohn puede estar genéticamente determinado. En cuanto a la colitis ulcerosa parece ser que el componente genético es menor que en la EC. La tasa de concordancia en este caso es del 16% en gemelos idénticos y del 4% en dizigóticos. De la misma manera, la concordancia para las características fenotípicas en parejas de gemelos con colitis ulcerosa es menos consistente (31).

Por otro lado, mediante el estudio de familias se ha podido observar que la proporción de personas que desarrollan enfermedad de Crohn, teniendo historia familiar de esta enfermedad, varía del 2% al 14%, y del 5% al 16% si tienen historia familiar de cualquier tipo de EII. Mientras que para los enfermos de CU sería del 7% al 11% en el primer caso y del 8% al 14% en el segundo. Sin embargo, la metodología utilizada para los diferentes estudios familiares varía, por lo que no sería adecuado comparar los datos obtenidos en cada uno de ellos. A pesar de ello, todos coinciden en que los parientes de primer grado, especialmente los hermanos, son los que tienen un mayor riesgo de padecer la enfermedad, siendo más común una historia familiar positiva entre los pacientes de EC que en los de CU.

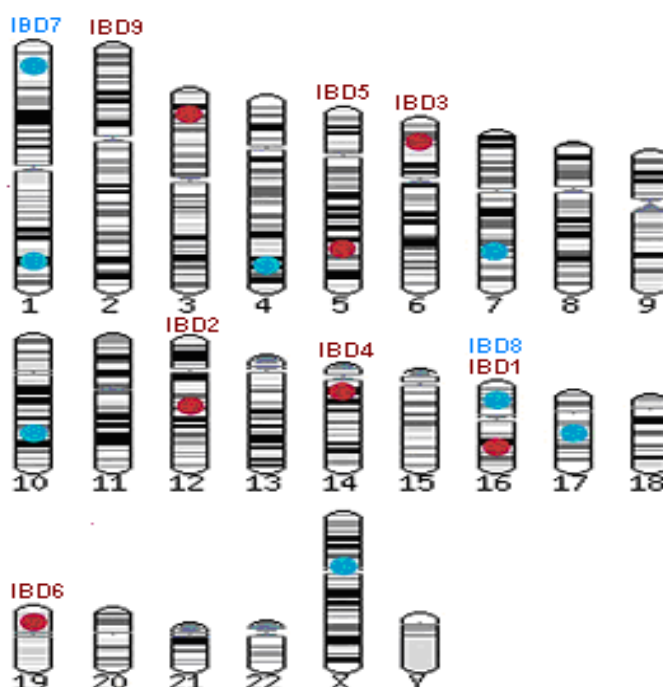
Por tanto, podemos decir que la enfermedad inflamatoria intestinal es una enfermedad multifactorial que no sigue un patrón mendeliano, ya que están implicados tanto factores ambientales como genéticos. De este modo, una mutación en un único gen no es suficiente para que se desarrolle la enfermedad. Por lo tanto esta patología constituye un desorden complejo multigénico en el que pueden estar implicados desde unos pocos genes hasta varios cientos y no todos contribuirán igualmente a la patología.

## 1.6 Genética de la enfermedad inflamatoria intestinal

Una vez que se establece que la enfermedad inflamatoria intestinal tiene un componente genético comienzan a realizarse estudios para determinar cuales son los genes implicados en la patología. A lo largo del tiempo se han llevado a cabo tres tipos de estudios.

### 1.6.1 Estudios de ligamiento

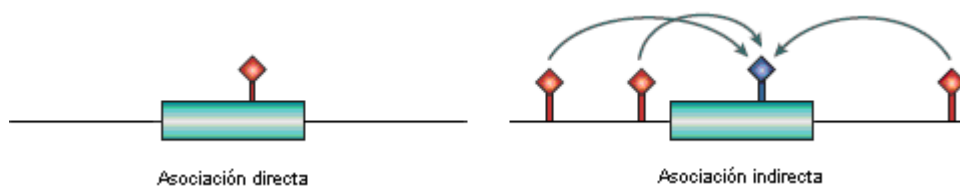
Los primeros estudios que se llevaron a cabo son los estudios de ligamiento que consisten en analizar marcadores genéticos, concretamente microsatélites, a lo largo de todo el genoma, con el fin de identificar regiones cromosómicas que cosegregan con la presencia de enfermedad en familias con varios individuos afectados. De esta manera se encuentran regiones amplias compartidas entre individuos enfermos que pueden incluir varias decenas de genes. Este tipo de estudio ha permitido identificar varios “loci” de susceptibilidad a la EII, llamados IBD 1-9 (“inflammatory bowel disease”), algunos de los cuales son específicos de la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn mientras que otros son comunes a ambas patologías.



**Figura 3.** Regiones ligadas a la enfermedad inflamatoria intestinal (figura obtenida de Baumgart et al (32)).

### 1.6.2 Estudios de asociación de genes candidatos

Los estudios de asociación permiten identificar regiones asociadas, de menor tamaño que en el caso anterior, de uno o unos pocos genes. Los marcadores de preferencia en este tipo de estudios son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), mucho más abundantes que los microsatélites. Los estudios de asociación se centran en el análisis de genes candidatos atendiendo a criterios funcionales, cuando se analizan genes que por su función puedan estar implicados en la patología, y posicionales, cuando se analizan genes localizados en regiones cromosómicas en las que se haya sugerido previamente la existencia de cosegregación mediante estudios de ligamiento en familias. Los estudios de asociación tratan de identificar la asociación entre un gen candidato y una patología mediante la detección de diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre casos y controles. Una estrategia comúnmente empleada en este tipo de estudios es la denominada estrategia directa que consiste en analizar la distribución de una variante que se supone que puede ser funcional, por ejemplo porque da lugar a un cambio en la secuencia aminoacídica o afecta al sitio de unión de algún factor de transcripción. La principal limitación de este método es que requiere el conocimiento previo de las posibles variantes funcionales del gen candidato y muchas veces esto no es posible. Por el contrario, la estrategia indirecta consiste en analizar SNPs marcadores; es decir, polimorfismos que aunque no sean los causantes directos de la variación en la susceptibilidad, se encuentran en desequilibrio de ligamiento (DL) con la variante causal (figura 4). El desequilibrio de ligamiento se define como la aparición en el mismo cromosoma de dos variantes alélicas con una frecuencia significativamente mayor de la esperada por azar. Dado que el DL no abarca regiones tan amplias como el ligamiento, los estudios de asociación acotan regiones más pequeñas que los estudios de ligamiento en familias. El desequilibrio de ligamiento varía de unas poblaciones a otras (33), por eso en este tipo de estudios es importante que los resultados sean replicados en distintas poblaciones así como analizar más de un marcador, puesto que un resultado positivo podría deberse al particular DL que hubiera en una población concreta.



**Figura 4.** Análisis de asociación de polimorfismos mediante métodos directos e indirectos.

Esta metodología permitió la identificación de varias regiones asociadas a la enfermedad inflamatoria intestinal pero solo tres, que se corresponden con las regiones de ligamiento IBD1, IBD3 e IBD5, se han replicado consistentemente.

- ❑ **IBD1:** en la enfermedad de Crohn, la evidencia más fuerte de ligamiento se encontró en la región 16q21, a la que se llamó IBD1 (34). Posteriormente, mediante análisis de genes candidatos se identificó una asociación fuerte con un solo gen dentro de este “locus”, el gen *CARD15* (“caspase-recruitment domain protein 15”) también llamado *NOD2* (“nucleotide-binding oligomerization domain containing 2”), que confería susceptibilidad a la EC (20, 21). Este gen está formado por tres dominios que comparte con una amplia familia de genes denominada CATERPILLER y codifica una proteína que se expresa en monocitos, granulocitos, células dendríticas y células epiteliales. La mayoría de las mutaciones asociadas a la EC se localizan en una región rica en leucina que sirve de región de unión a ligando. Los hallazgos iniciales sugerían que la proteína *CARD15* podía actuar como un sensor intracelular del lipopolisacárido bacteriano, sin embargo, estudios posteriores indicaron que el patrón molecular reconocido por *CARD15* es el muramil dipéptido (MDP), un componente común de la pared de las bacterias gram positivas y gram negativas (35). La activación de *NOD2* por MDP resulta en la activación de las vías de señalización NF- $\kappa$ B y MAPK (“mitogen-activated protein kinase”) (36). El muramil dipéptido entraría en el citosol mediante la proteína transportadora hPepT1 e interaccionaría con la región rica en leucina de la proteína. Secuenciando este gen en pacientes con enfermedad de Crohn, se encontró la inserción de una citosina en la posición 3020 del exón 11, que da lugar a un codón de terminación y por tanto a una proteína *CARD15* truncada. Se han identificado también dos mutaciones de cambio de sentido: Arg702Trp y Gly908Arg. Estas mutaciones se asocian específicamente a pacientes con enfermedad de Crohn, no a colitis ulcerosa. Un meta-análisis de 39 estudios mostró que la “odds ratio” para un heterocigoto simple es 2.4 (2.0-2.9), mientras que para el homocigoto es 17.1 (10.7-27.2) (37). Los heterocigotos compuestos, es decir, los individuos que tienen una mutación en un cromosoma y otra distinta en el homólogo, funcionan como homocigotos. Se ha establecido que entre el 8% y el 17% de los pacientes de enfermedad de Crohn caucásicos tienen dos copias de los principales alelos de riesgo de *CARD15*. Sin embargo, los individuos normales también pueden presentar ocasionalmente

mutaciones en ambos cromosomas en ausencia de enfermedad (38). Por otro lado, en otras poblaciones como la japonesa no existe ninguna de estas mutaciones y, por lo tanto, no son un factor de susceptibilidad a la enfermedad de Crohn en estas poblaciones asiáticas (39).

A pesar de estos hallazgos, aún permanece sin esclarecer completamente el papel de *CARD15* en la enfermedad de Crohn. En células mononucleares humanas, las mutaciones en el gen parecen reducir la activación de NF- $\kappa$ B en respuesta a la estimulación con MDP (40). Sin embargo, esto contrasta con el aumento de activación de NF- $\kappa$ B que se observa en la lámina propia de los enfermos de Crohn (41). Otros estudios sugieren que las mutaciones resultan en una ganancia de función de las células afectadas, específicamente con respecto a la producción de citoquinas proinflamatorias. Así, usando modelos de ratón se ha visto que la proteína CARD15 puede actuar como un importante regulador de la activación de NF- $\kappa$ B en respuesta al sistema de activación TLR2 (42). De manera que cuando no existe ninguna mutación, el gen *CARD15* disminuye la actividad de NF- $\kappa$ B, pero en los portadores de la proteína mutante este proceso no ocurre y se producen citoquinas proinflamatorias con un perfil Th1 como el que aparece en la enfermedad de Crohn. Estos hallazgos contradictorios podrían deberse a diferencias en las técnicas utilizadas tales como concentración de ligando, células humanas o de ratón, y linfocitos periféricos o de la mucosa.

- **IBD3:** En este “locus”, localizado en el cromosoma 6p21.1-23, se encuentra la región genética estudiada más profundamente en la enfermedad inflamatoria intestinal, el complejo HLA. Consiste en un conjunto de genes altamente polimórficos y que presentan un elevado desequilibrio de ligamiento, es decir, la tasa de recombinación es baja o inexistente, por lo que alelos localizados en distintos “loci” tienden a transmitirse conjuntamente formando haplotipos que se heredan de padres a hijos. El complejo HLA está formado por los genes HLA de clase I que presentan péptidos a los linfocitos T CD8, HLA de clase II que presentan péptidos a los linfocitos T CD4 y HLA de clase III entre los que se encuentran genes que codifican los componentes del sistema del complemento, las citoquinas TNF $\alpha$  y TNF $\beta$ , etc. Además de en la EII, esta región se ha estudiado en muchas otras enfermedades con componente inmunológico ya que algunos de estos genes participan en la regulación de la respuesta inmune.

Los estudios iniciales mostraron evidencias de ligamiento de la región IBD3 con la CU y

la EC, incluso más fuerte que el “locus” que contiene el gen *CARD15* (43). Posteriormente, se ha visto que son determinados alelos HLA, localizados en este “locus”, los que se asocian con ambas patologías.

En la colitis ulcerosa, la asociación que ha sido replicada en más ocasiones en población europea y americana es la que presenta con el alelo *HLA-DRB1\*0103*. Este alelo confiere una susceptibilidad moderada a la colitis ulcerosa considerada globalmente (44); sin embargo, muestra una asociación particularmente fuerte con la colitis extensa, las manifestaciones extraintestinales y la refractariedad a tratamientos. Por otro lado, el alelo *HLA-DRB1\*03* parece conferir una protección fuerte a la colitis ulcerosa (45).

En cuanto a la enfermedad de Crohn, se ha encontrado que el alelo *HLA-DRB1\*0103* confiere susceptibilidad, al igual que ocurre en la CU. Concretamente, la mayor asociación de este alelo se observa con la forma colónica de la enfermedad, lo que apunta a una etiología común con la CU (46). El alelo *HLA-DRB1\*07* también presenta una asociación positiva con la EC, pero en este caso con la forma ileal (46). Además se ha visto que la asociación con este alelo sólo está presente en aquellos pacientes que no poseen ninguna de las tres mutaciones asociadas a enfermedad en el gen *CARD15* (47).

- **IBD5:** esta región, localizada en el cromosoma 5q31, incluye un agrupamiento de genes de citoquinas. Además, dentro de ella se encuentran dos genes que codifican transportadores de cationes orgánicos, *OCTN1/SLC22A4* (“organic cation transporter 1”/“solute carrier family 22, member 4”) y *OCTN2/SLC22A5* (“organic cation transporter 2”/“solute carrier family 22, member 5”), y forman un único bloque de elevado desequilibrio de ligamiento. Se han identificado dos mutaciones dentro de estos genes, 1672C/T en el primero y -207G/C en el segundo. En un primer estudio vieron que el haplotipo TC, en estas dos posiciones, aumentaba la susceptibilidad a padecer la enfermedad de Crohn y los investigadores propusieron que *OCTN1* y *OCTN2* contribuyen a la enfermedad independientemente de otros marcadores de la región (48). En estudios posteriores también se ha encontrado este haplotipo de susceptibilidad para la EC, pero no se hallaron evidencias de que sea una asociación independiente de la encontrada previamente en 5q31. Es posible que el haplotipo TC esté en desequilibrio de ligamiento con otra variante crucial en la enfermedad. No



olvidemos que en esta región existen genes tan importantes como *IL-4*, *IL-5*, *CSF2* ("colony stimulating factor 2 precursor") e *IRF1* ("interferon regulatory factor 1").

### **1.6.3 Estudios de asociación mediante barrido genómico**

Los estudios de asociación por barrido genómico ("Genome Wide Association Studies", GWAS) analizan cientos de miles de polimorfismos del genoma humano. Esta metodología surgió hace unos años, debido, principalmente, al progreso del Proyecto Genoma Humano, el desarrollo del Proyecto HapMap y a la reducción del coste gracias a la comercialización de plataformas de genotipado. El Proyecto Genoma Humano permitió conocer las variaciones genéticas humanas más comunes tales como microsatélites, variaciones en el número de copias ("copy number variation", CNV) y polimorfismos de un solo nucleótido. Los SNPs son las variaciones más utilizadas en los estudios de barrido genómico aunque cada vez se están incorporando más CNVs. El proyecto HapMap estableció las frecuencias de los distintos SNPs en cuatro poblaciones diferentes y los patrones de correlación entre estos SNPs, es decir los haplotipos. Esto permite, a la hora de realizar un estudio, seleccionar un grupo de polimorfismos, conocidos como "tag SNPs", que proporcionan la máxima información sobre los SNPs no tipados, de manera que se puede reducir la cantidad de polimorfismos genotipados en un estudio sin disminuir sustancialmente la cantidad de información generada. De forma paralela se desarrollaron plataformas de genotipado que son capaces de analizar hasta un millón de polimorfismos simultáneamente en un solo microarray sin un coste demasiado elevado.

Estos estudios de barrido genómico han replicado algunas de las asociaciones establecidas anteriormente y además han encontrado nuevas regiones asociadas a la enfermedad inflamatoria intestinal. Desde el año 2005, en el que se publicó el primer estudio de barrido genómico en la enfermedad de Crohn (49), han aparecido ocho GWAS en esta patología (50-57), seis en la colitis ulcerosa (58-63) y dos en la enfermedad inflamatoria intestinal de debut temprano (64, 65). Sin embargo, estos estudios presentan una potencia estadística baja para detectar efectos pequeños, como lo son la mayoría de los hallados hasta ahora, y en numerosas ocasiones las asociaciones observadas en un estudio no se replican en otros. Por esta razón se han llevado a cabo estudios de meta-análisis que engloban varios de estos GWAS, con el fin de aumentar el tamaño muestral, tanto en la EC (66, 67) como en la CU (68). De esta manera, estos estudios de barrido genómico junto con los estudios de replicación, incluyendo nuestros propios resultados, han contribuido al establecimiento de setenta y una

regiones asociadas a la enfermedad de Crohn y treinta a la colitis ulcerosa, algunas de ellas comunes a ambas patologías. En la tabla 3 se muestran los “loci” más claramente asociados a la EII, además de los tres comentados anteriormente, *CARD15*, 6p21 y 5q31. En algunos casos se ha identificado el gen responsable, pero en otros la señal de asociación se localiza en regiones intergénicas ó en regiones con una elevada densidad de genes.

Tabla 3. Regiones cromosómicas definitivamente asociadas y replicadas en la enfermedad de Crohn y en la colitis ulcerosa actualmente.

Región cromosómica	Gen*	EC	CU
1q31	<i>IL10</i>	No	Sí
1q21	<i>ECM1</i>	No	Sí
1p31	<i>IL23R</i>	Sí	Sí
1p36	Varios ( <i>PLA2G2E</i> )	No	Sí
2q37	<i>ATG16L1</i>	Sí	No
2p16	Varios ( <i>REL</i> )	Sí	Sí
3p21	Varios ( <i>MST1</i> )	Sí	Sí
5q33	<i>IRGM</i>	Sí	Sí
5p13	Región intergénica ( <i>PTGER4</i> )	Sí	Sí
5p15	Varios ( <i>CEP72</i> , <i>TPPP</i> )	No	Sí
7q31	Varios ( <i>LAMB1</i> )	No	Sí
9q32	Varios ( <i>TNFSF15</i> )	Sí	Sí
9q34	<i>CARD9</i>	No	Sí
10q21	Varios ( <i>ZNF365</i> )	Sí	No
10q24	<i>NKX2-3</i>	Sí	Sí
12q15	Muchos ( <i>IFNG-IL26</i> )	No	Sí
17q12	<i>ORMDL3</i>	Sí	Sí
18p11	<i>PTPN2</i>	Sí	No
21q22	<i>PSMG1</i>	Sí	Sí

\* Entre paréntesis se muestra el gen candidato más probable.

A continuación se describe brevemente el papel de algunas de estas regiones en la enfermedad inflamatoria intestinal (el resto serán comentadas más en profundidad en un apartado posterior, ya que han sido objeto de nuestro estudio).

- ❑ **IL10:** este gen codifica una citoquina anti-inflamatoria producida principalmente por monocitos y en menor medida por linfocitos. Esta citoquina inhibe la presentación antigénica y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias Th1, aumenta la supervivencia y proliferación de las células B y la producción de anticuerpos. Además, puede bloquear la actividad NF- $\kappa$ B y está involucrada en la regulación de la vía de señalización JAK-STAT (“janus kinase-signal transducer and activator of transcription”), a través de la cual transmiten sus señales muchos receptores de citoquinas mediante la inducción de la expresión de SOCS3 (“suppressor of cytokine signaling 3”). Como hemos mencionado con anterioridad, IL-10 participa en la homeostasis intestinal, así estudios con ratones “knockout” para este gen muestran que esta citoquina actúa como un inmunorregulador esencial en el tracto intestinal (69).
- ❑ **ECM1** (“extracellular matrix protein 1”): codifica una glicoproteína que interacciona con la membrana basal y se expresa en el intestino delgado y grueso. Se ha descrito que esta proteína activa fuertemente la señalización NF- $\kappa$ B (60).
- ❑ **Región 1p36: PLA2G2E** (“Phospholipase A2, Group IIE”) es el candidato más plausible para ser responsable de la asociación observada en la región 1p36. Este gen codifica una proteína que libera ácido araquidónico a partir de fosfolípidos de membrana, lo cual lleva a la producción de mediadores lipídicos pro-inflamatorios, tales como prostaglandinas y leucotrienos. Además, la expresión de *PLA2G2E* en el intestino delgado es inducida por la estimulación con lipopolisacárido, sugiriendo un papel en la inflamación mediada por bacterias (63).
- ❑ **Región 2p16:** las señales de asociación observadas en esta región se localizan en el gen *PUS10* (“pseudouridylate synthase 10”). Este gen codifica una enzima que convierte la uridina en pseudouridina, una vez que ha sido incorporada a una molécula de ARN, participando en la estabilización de la estructura secundaria y terciaria de muchos ARNs. Por lo tanto, la función que desempeña esta proteína no parece

otorgarle un papel en la EII. Sin embargo, en esta región también se localiza el gen *REL* (“v-rel reticuloendoteliosis viral oncogene homolog (avian)”), que pertenece a la familia de factores de transcripción NF- $\kappa$ B/REL y codifica la proteína c-Rel que juega un papel crítico en el control de la expresión de una gran variedad de genes que controlan las respuestas inmunes. El gen *REL* se ha visto implicado en otras enfermedades inflamatorias como la enfermedad celiaca (70) y la artritis reumatoide (71).

- ❑ ***PTGER4*** (“prostaglandin E receptor 4, subtype EP4”): en la región 5p13 la asociación más significativa se observó en un desierto génico flanqueado por varios genes candidatos, incluyendo *CARD6*, los factores del complemento C6, C7 y C9 y *PTGER4* (55). Posteriormente, en este mismo estudio se compararon los datos de los SNPs de esta región con los niveles de expresión de ARNm de los genes flanqueantes, observándose que varios polimorfismos estaban correlacionados con los niveles de expresión de *PTGER4*, incluyendo un SNP que estaba además asociado a la enfermedad de Crohn. Sin embargo, el alelo de susceptibilidad de este marcador se corresponde con un aumento de la expresión del gen, lo cual no es consistente con el aumento de la susceptibilidad a colitis observado en ratones deficientes en *PTGER4* (72). Este gen codifica uno de los cuatro receptores identificados para la prostaglandina E2 que, como se mencionó anteriormente, participa en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (6).
- ❑ **Región 5p15:** en esta región se localizan los genes *CEP72* (“centrosomal protein 72kDa”) y *TPPP* (“tubulin polymerization promoting protein”), ambos codifican proteínas implicadas en la organización de los microtúbulos y se expresan ubiquamente. No está muy clara cuál puede ser su participación en la patogénesis de la colitis ulcerosa.
- ❑ **Región 7q31:** el candidato más probable localizado cerca de los SNPs asociados a la colitis ulcerosa en esta región es el gen *LAMB1* (“laminin, beta-1”), que codifica la cadena beta 1 de la laminina. Las lamininas se expresan en la membrana basal intestinal y tienen un papel clave en el anclaje al epitelio. Se ha observado que la expresión de lamininas se encuentra disminuida en la colitis ulcerosa (73).
- ❑ ***TNFSF15*** (“tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15”): codifica una

citoquina que pertenece a la familia del TNF y se expresa abundantemente en células endoteliales. La expresión de esta proteína es inducida por TNF e IL-1 $\alpha$  y puede activar la vía de NF- $\kappa$ B y la cascada de las MAPK implicada principalmente en la proliferación celular (49). Los niveles de ARNm y proteína TNFSF15 se han encontrado aumentados en macrófagos y linfocitos de la lámina propia intestinal de pacientes de Crohn (74).

- ❑ **CARD9** (“caspase recruitment domain family, member 9”): este gen codifica una proteína que pertenece a la familia de proteínas CARD y es esencial en la estimulación del sistema inmune innato por patógenos intra y extracelulares (75). Varios estudios con ratones deficientes en CARD9 han mostrado que esta proteína es requerida para inducir la respuesta de citoquinas y para la protección frente a infecciones bacterianas y fúngicas (76, 77). Se cree que CARD9 está involucrado en la patogénesis de la EII a través de la regulación de la respuesta IL-17 frente a los patógenos (78).
- ❑ **Región 10p21**: en este caso la asociación encontrada implicaba una región cromosómica de 70 kb que no contiene ningún gen codificante conocido. Esta región intergénica está flanqueada por dos genes que codifican proteínas que contienen dedos de zinc, *ZNF365* (“zinc finger protein 365”) y *EGR2* (“early growth response 2”) (57). Se conoce muy poco acerca de estos dos genes, no obstante se ha observado que EGR2 parece ser un regulador negativo de la activación de las células T en ratones (79).
- ❑ **Región 12q15**: es una región desprovista de genes, sin embargo *IFNG*, *IL26* e *IL22* se localizan cerca del polimorfismo más asociado a la colitis ulcerosa. IFN- $\gamma$  es crítico en la respuesta inmune a patógenos ya que regula la función de los macrófagos y distintos niveles de la homeostasis intestinal, incluyendo subclases de células T, NK y NKT. IL-22 e IL-26 son producidas por las células Th17, que como ya se ha comentado parecen estar implicadas en la patología de la EII (63). Además, se ha observado que IL-22 puede tener un papel protector durante la inflamación intestinal aguda (80).
- ❑ **ORMDL3** (“orosomucoid 1-like3”): la región donde se localiza este gen se ha visto implicada en varias enfermedades en las que existe una desregulación del sistema

inmune, aunque aún no se conocen los mecanismos implicados (81). La proteína ORMDL3 se localiza principalmente en el retículo endoplásmico y participa en el plegamiento de proteínas. Se han encontrado evidencias de interacciones entre la respuesta a proteínas no plegadas y las respuestas inmunes (82).

- ❑ ***PTPN2*** (“protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2”): este gen codifica una proteína tirosina fosfatasa de las células T que actúa como un regulador negativo de las respuestas inflamatorias. Los ratones “knockout” para la proteína codificada por el gen *PTPN2* presentan un aumento de la expresión de varias citoquinas Th1 como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 (83).
- ❑ **Región 21q22:** la señal detectada en esta región se localiza en una pequeña región de desequilibrio de ligamiento que no contiene genes. El gen más cercano es *PSMG1*, “proteasome assembly chaperone 1”, cuyo producto interacciona físicamente con el factor de transcripción PPARbeta/delta (peroxisome-proliferator-activated receptor beta/delta) que a su vez está implicado en la modulación de la inflamación en la EI (84).

Aunque en los últimos años se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de la genética de la enfermedad inflamatoria intestinal, los factores de susceptibilidad encontrados hasta el momento no explican completamente el componente genético. Los estudios de barrido genómico han permitido identificar numerosas regiones implicadas, sin embargo presentan una serie de limitaciones. Los estudios que se han realizado hasta la fecha no tienen suficiente potencia estadística para detectar variantes genéticas con efectos pequeños en la patología. Por otro lado, las plataformas de genotipado han sido desarrolladas para analizar variaciones comunes en las que la frecuencia del alelo minoritario sea mayor del 5%, por lo que, debido a que las variantes raras no están en desequilibrio de ligamiento con los SNPs genotipados en los GWAS, estos no son capaces de capturar su contribución a la enfermedad. Además, en la mayoría de las ocasiones, las señales detectadas mediante los GWAS no se han podido correlacionar con el polimorfismo etiológico sino que, principalmente, se deben a marcadores en desequilibrio de ligamiento con la verdadera variante causal. Esto lleva a la obtención de resultados contradictorios en estudios llevados a cabo en distintas poblaciones, ya que los patrones de desequilibrio de ligamiento varían de unas poblaciones a otras, incluso entre

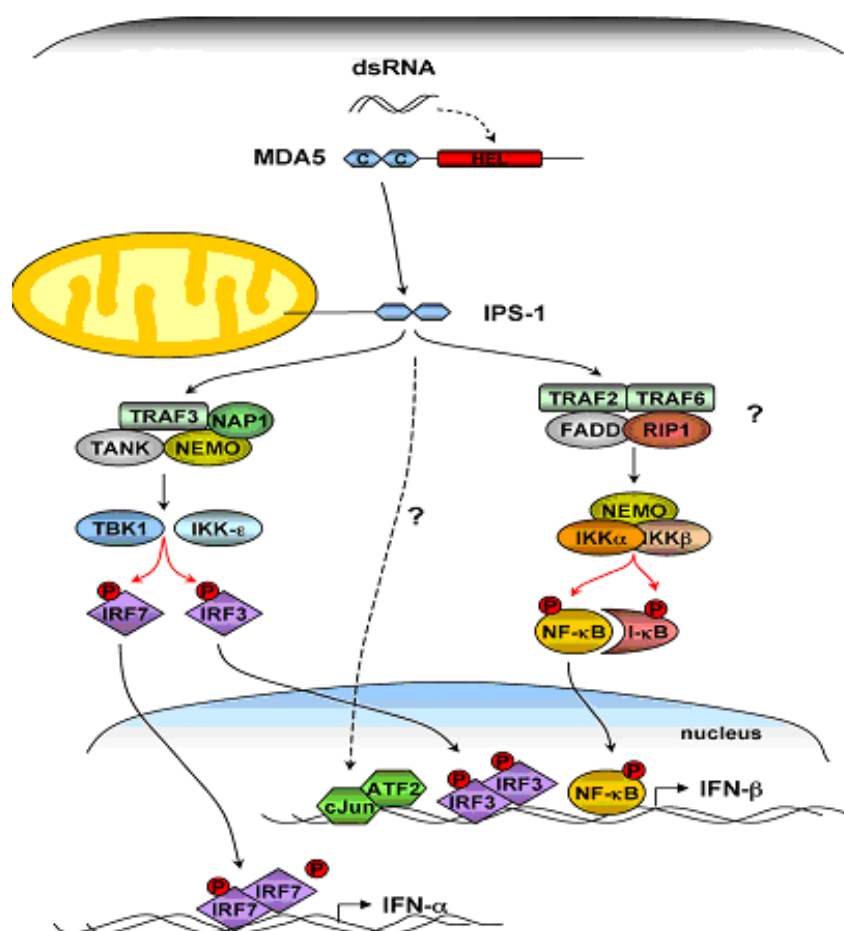
poblaciones de origen europeo (85). Por otro lado, los estudios de barrido genómico, al realizar múltiples comparaciones, establecen un umbral de significación muy restrictivo ( $5 \times 10^{-8}$ ) lo que puede originar muchos falsos negativos. Finalmente, los GWAS presentan limitaciones para identificar interacciones gen-gen y gen-ambiente.

## 1.7 Genes estudiados

Como ya hemos mencionado, los estudios llevados a cabo en la enfermedad inflamatoria intestinal han revelado que una eliminación efectiva de los patógenos y una discriminación adecuada entre estos y la flora comensal es esencial para el mantenimiento de la homeostasis intestinal. En este proceso desempeñan un papel fundamental los receptores de patrones moleculares asociados a patógenos; de hecho, los dos tipos principales de receptores, TLRs y NLRs, han sido implicados en la patología en numerosos estudios. En este trabajo hemos analizado dos genes que codifican PPRs, *CLEC16A* e *IFIH1*.

- ❑ ***IFIH1*** (“interferon induced with helicase C domain 1”): este gen, también llamado *MDA5* (“melanoma differentiation associated protein-5”), codifica una proteína que pertenece a una familia de PRRs llamada “RIG-like helicase receptors” (RLRs). Los miembros de esta familia son proteínas solubles que “inspeccionan” el citoplasma en busca de señales de la presencia de invasores intracelulares, concretamente, la proteína IFIH1 reconoce ARN viral de doble hebra.

Esta proteína presenta dos dominios CARD (“caspase recruitment domain”) amino terminales, seguidos por un dominio ARN helicasa. Cuando IFIH1 se activa, interacciona, mediante una interacción CARD-CARD, con IPS-1 (“IFN- $\beta$  promotor stimulator-1”), también llamado Cardif (“CARD adaptor inducing IFN- $\beta$ ”), que se encuentra anclado a la membrana mitocondrial externa, lo que desencadena la activación de NF- $\kappa$ B, IRF3 (“interferon regulatory factor 3”) e IRF7 (“interferon regulatory factor 7”), los cuales cooperan en la inducción de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ .



**Figura 5.** Vía de señalización antiviral de IFIH1 (MDA5) (figura adaptada de Unterholzner et al (86)).

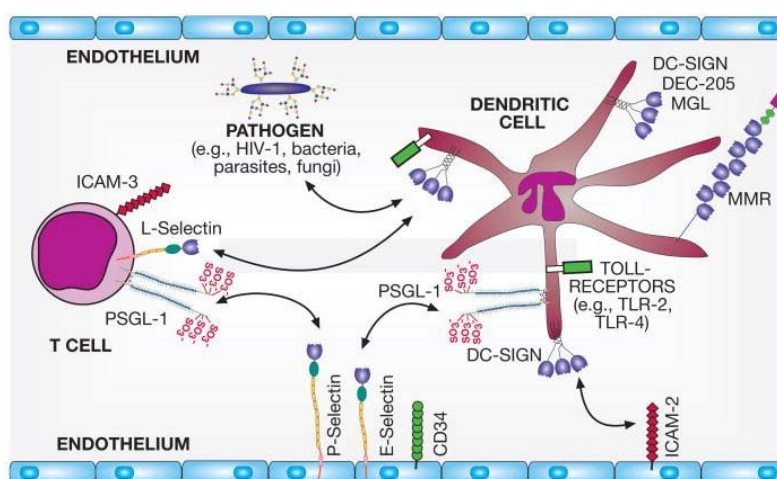
ATF2, "activating transcription factor 2"; ds, "double-stranded"; FADD, "Fas-associated via death domain"; IKK, "I-κb kinase"; IPS-1, "interferon-β promoter stimulator-1"; NAP, "NAK-associated protein"; NEMO, "NF-κB essential modulator"; RIP, "receptor interacting protein"; TANK, "TRAF family member-associated NF-κB activator"; TBK, "TANK-binding kinase"; TRAF, "tumor necrosis factor receptor-associated factor".



La región 2q24, donde se localiza el gen *IFIH1*, se vió inicialmente asociada a la diabetes tipo 1 en un estudio de barrido genómico, utilizando polimorfismos no sinónimos (87). La señal de asociación más fuerte correspondía a un polimorfismo que da lugar al cambio aminoacídico Ala946Thr, pero un estudio más profundo de la región permitió identificar más variantes implicadas.

Dado que muchas enfermedades autoinmunes comparten factores genéticos, así como por la función de la proteína IFIH1 en el reconocimiento de patógenos, decidimos determinar si el gen que la codifica está implicado en la susceptibilidad a padecer la enfermedad inflamatoria intestinal. Con esta finalidad, analizamos cuatro polimorfismos en esta región incluyendo el SNP no sinónimo, previamente asociado a DT1.

- **CLEC16A** (“C-type lectin domain family 16, member A”) codifica una proteína que se expresa casi exclusivamente en células del sistema inmune, concretamente células dendríticas, linfocitos B y células NK. Aunque aún no se conoce la función de esta proteína, se cree que pertenece a la familia de las lectinas de tipo C ya que, al igual que éstas, presenta un dominio de unión a carbohidratos dependiente de calcio (CRD). Las lectinas de tipo C son receptores de reconocimiento de patrón cuya función principal es reconocer e internalizar antígenos glicosilados para que sean procesados y presentados por las moléculas HLA de clase I y II. Se ha descrito que algunas de estas lectinas son capaces de reconocer auto-antígenos pudiendo llevar a cabo dos funciones: participar en el control homeostático y mediar procesos celulares tales como señalización, adhesión y migración celular. Además, las lectinas de tipo C pueden modular reacciones inmunes a través de la comunicación con otros receptores, principalmente TLRs (88).



**Figura 6.** Papel de algunas lectinas tipo-C en la respuesta inmune innata (figura obtenida de Varki et al (89)).

CD, "cluster of differentiation"; DC-SIGN, "dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin"; DEC-205, "dendritic and epithelial cell, 205 kDa"; HIV, "human immunodeficiency virus"; ICAM, "intercellular adhesion molecule"; MGL, "macrophage galactose-type lectin"; MMR, "macrophage mannose receptor"; PSGL, "selectin P ligand".

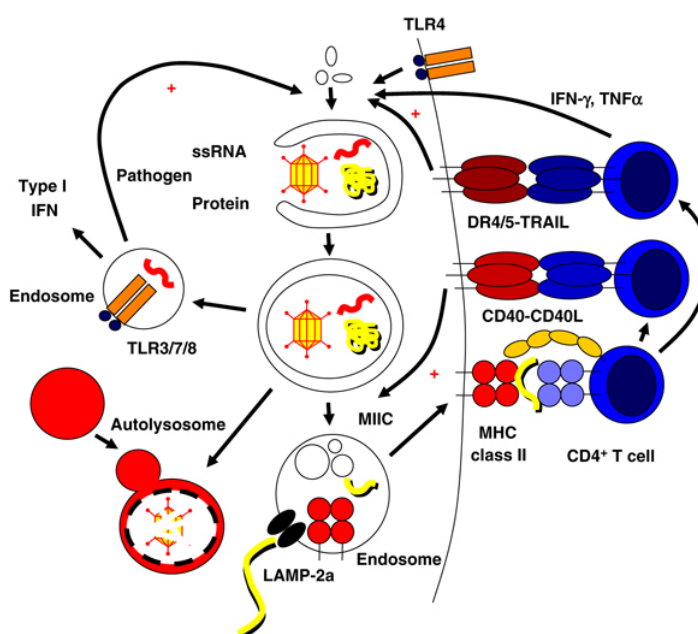
En un estudio de barrido genómico llevado a cabo en enfermos de diabetes tipo 1 (DT1), se observó una señal de asociación en un bloque de desequilibrio de ligamiento de 233 kb, situado en la región cromosómica 16p13, en la que se localiza únicamente el gen *CLEC16A* (90). Los alelos minoritarios de tres SNPs, en fuerte desequilibrio de ligamiento, conferían protección a la enfermedad. En este mismo estudio, se analizó la expresión del gen *CLEC16A* en cuatro líneas de células NK diferentes, y se encontró un ligero aumento de la expresión en la única línea celular homocigota para uno de estos alelos de protección. Simultáneamente, en otro GWAS realizado en esclerosis múltiple, se encontró asociación con un polimorfismo localizado en esta misma región (91).

Por la función que presumiblemente lleva a cabo la proteína codificada por este gen y por su asociación a otras enfermedades autoinmunes, nos pareció apropiado estudiar su papel en la enfermedad inflamatoria intestinal. Para ello analizamos dos polimorfismos, uno asociado a DT1, con una posible implicación funcional, y otro a

esclerosis múltiple en los estudios mencionados.

En los últimos años, diversos estudios han establecido que la unión de determinados TLRs a sus ligandos puede desencadenar, entre otras cosas, la activación de la vía de la autofagia (92, 93). Tradicionalmente, la autofagia se ha considerado un proceso celular muy conservado que utilizan todas las células eucariotas, en su forma más básica, para autodigerir componentes celulares en condiciones de escasez de nutrientes, reciclar orgánulos dañados y degradar proteínas de vida larga. Sin embargo, estudios recientes llevados a cabo por múltiples grupos han revelado el importante papel de la autofagia en la inmunidad innata y adaptativa. La primera evidencia de la relación entre esta vía y el sistema inmune fue el descubrimiento de que las células pueden utilizar este mecanismo para eliminar patógenos intracelulares. Diversos estudios han demostrado este importante papel tanto “in vitro” como “in vivo” (94-97). Además, el mecanismo de autofagia parece estar regulado por citoquinas inmunológicamente relevantes, así  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IFN-}\gamma$  inducen esta vía, mientras que citoquinas Th2 (“T helper 2”) como IL-4 e IL-13 la inhiben (98). La implicación de la autofagia en la inmunidad adaptativa ha sido establecida por estudios que demuestran que la autofagia promueve la presentación de antígenos citosólicos por moléculas HLA de clase II (99, 100). Además, un estudio reciente ha implicado este proceso en la tolerancia central influyendo en la selección negativa y positiva de los linfocitos T en el timo (101).

El proceso mediante el cual la vía de la autofagia captura los patógenos comienza con la formación de una estructura conocida como “membrana de aislamiento” que engloba la partícula que va a ser ingerida. A continuación el patógeno es secuestrado en una vacuola citosólica de doble membrana llamada autofagosoma que más tarde se fusiona con lisosomas o endosomas.



**Figura 7.** Mecanismo de autofagia (figura obtenida de Lünemann et al (102)).

DR, "death receptor"; LAMP, "lysosome-associated membrane protein"; MHC, "major histocompatibility complex"; MIIC, "MHC class II containing compartment"; ss, "single-stranded"; TRAIL, "TNF-related apoptosis-inducing ligand".

En nuestro estudio hemos analizado dos genes implicados en esta vía, *ATG16L1* e *IRGM*.

- ***ATG16L1*** ("autophagy related 16-like 1"): este gen localizado en la región cromosómica 2q37 se expresa en células epiteliales intestinales, linfocitos T y B y células presentadoras de antígeno. La proteína que codifica está formada por el dominio amino terminal APG16, que presenta una estructura de doble hélice, y ocho repeticiones WD en el extremo carboxilo. *ATG16L1* participa en la elongación y estabilización del autofagosoma mediante la formación de un complejo con *ATG5* y *ATG12*, localizado en la cara citoplásmica de la membrana de aislamiento.

En un estudio de barrido genómico llevado a cabo con enfermos de Crohn, se encontró

que un polimorfismo localizado en *ATG16L1* mostraba una asociación con la enfermedad (54). Esta asociación ha sido replicada en estudios posteriores; sin embargo, no está claro si es específica de algún subgrupo clínico.

En este trabajo quisimos determinar si este polimorfismo también está asociado a Crohn en la población española. Además, decidimos realizar un meta-análisis con los estudios de asociación publicados (15, 50, 54, 57, 60, 103-113) además del nuestro, para determinar de forma más precisa el riesgo conferido por este polimorfismo así como para comprobar si se asocia de forma específica a algún subgrupo dentro de la enfermedad inflamatoria intestinal.

- ***IRGM*** (“immunity-related GTPase family, M”): en el ratón existen numerosos genes *IRG* cuya expresión es inducida por IFN- $\gamma$  y codifican proteínas implicadas en el control de patógenos intracelulares. En humanos solo aparecen dos genes pertenecientes a esta familia, uno de ellos es el gen *IRGM*, que es homólogo del gen *Irgm1* murino. El gen humano se diferencia del de ratón en que codifica una proteína truncada, que carece de la mayoría de los dominios amino y carboxilo terminales que flanquean el dominio de unión a GTP (guanósina trifosfato), y no responde a IFN- $\gamma$  sino que se expresa constitutivamente. La función de la proteína humana no se conoce con exactitud, pero experimentos en los que se reduce la expresión del gen *IRGM* han demostrado que tiene un papel en la autofagia y controla la carga intracelular de micobacterias (114). Además, los ratones deficientes en el gen *irg-47* tienen disminuida su capacidad para eliminar patógenos intracelulares (115).

En un estudio de barrido genómico (50) y una replicación independiente (116) se encontraron varios polimorfismos, localizados en el gen *IRGM* o próximos a él, asociados a la enfermedad de Crohn. Al igual que ocurría para el gen *ATG16L1*, decidimos analizar dos de los polimorfismos asociados a Crohn, para determinar si se asocian a la patología en nuestra población.

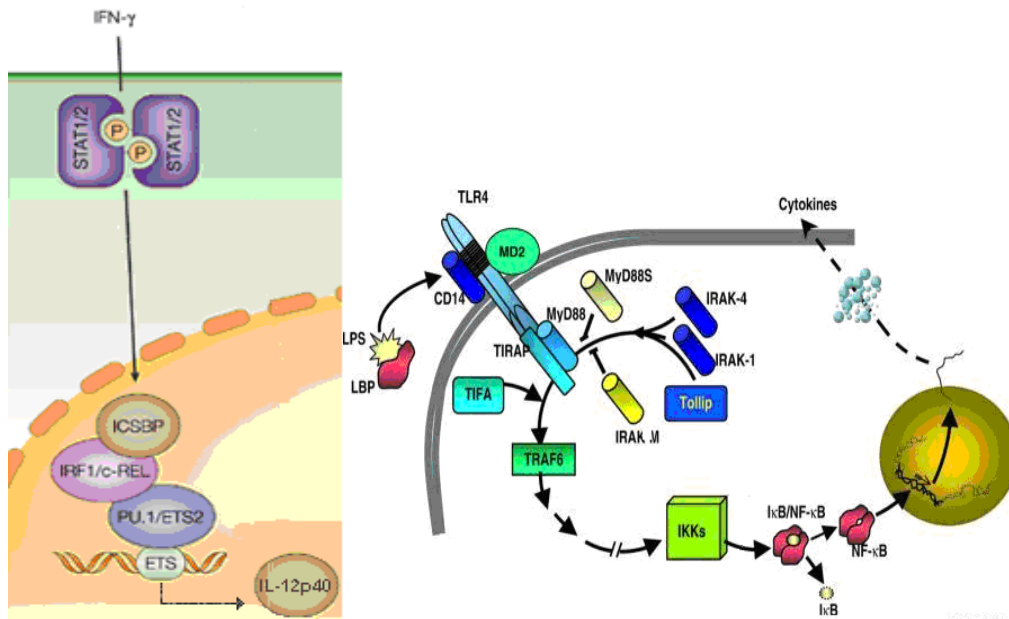
Tras el reconocimiento de patógenos o bacterias comensales se desencadena una cascada de señales que lleva a la producción de gran cantidad de mediadores inflamatorios. Entre estos mediadores destacan las citoquinas que actúan vía receptores específicos sobre las propias células que las producen o sobre otras células, desempeñando un papel crítico en la regulación del mecanismo de inflamación. En este trabajo hemos analizado varios genes que

codifican citoquinas y receptores de citoquinas.

- **MST1** (“macrophage stimulating 1”): es un factor de crecimiento sérico que se identificó originalmente por su capacidad para inducir cambios de forma, migración y fagocitosis en macrófagos peritoneales murinos. MST1 está estrechamente relacionado con el factor de crecimiento de hepatocitos y pertenece a una familia de proteínas caracterizadas por un dominio “kringle” y un dominio similar a los serín proteasa, pero inactivo. Esta proteína es producida por el hígado en la forma inactiva pro-MST1 de una sola cadena y es convertida a su forma activa, un heterodímero compuesto por una cadena  $\alpha$  y otra  $\beta$ , por varias enzimas de la cascada de coagulación. La conversión de pro-MST1 a MST1 puede ocurrir en los sitios de inflamación local pudiendo actuar entonces sobre macrófagos presentes en esos tejidos.

El receptor de MST1, llamado MST1R (“macrophage stimulating 1 receptor”), es un heterodímero compuesto por una cadena  $\alpha$  y otra  $\beta$  con actividad tirosín kinasa intrínseca. Este receptor se expresa en diferentes tipos celulares, pero principalmente en células de origen epitelial. En células inmunes, la expresión de MST1R aparece restringida a ciertos tipos de macrófagos tisulares incluyendo aquellos derivados de la cavidad peritoneal, piel, hígado y hueso.

MST1 inhibe la producción de mediadores inflamatorios por los macrófagos, incluyendo óxido nítrico y prostaglandinas. Estos efectos supresores son mediados por señales transducidas por MST1R que bloquean las cascadas enzimáticas inducidas por LPS, que llevan a la activación de NF- $\kappa$ B. Estudios “in vivo” han demostrado que la inactivación del gen *MST1R* resulta en respuestas inflamatorias incrementadas sugiriendo que este receptor es requerido para atenuar las respuestas inflamatorias “in vivo” (117). Más recientemente, se ha descrito que MST1 inhibe la producción de IL-12 reprimiendo la expresión de la subunidad p-40 y limitando así la producción de IFN- $\gamma$  (118).



**Figura 8.** Vías de señalización reguladas por MST1 (figuras adaptadas de Trinchieri et al y Villar et al (119, 120)).

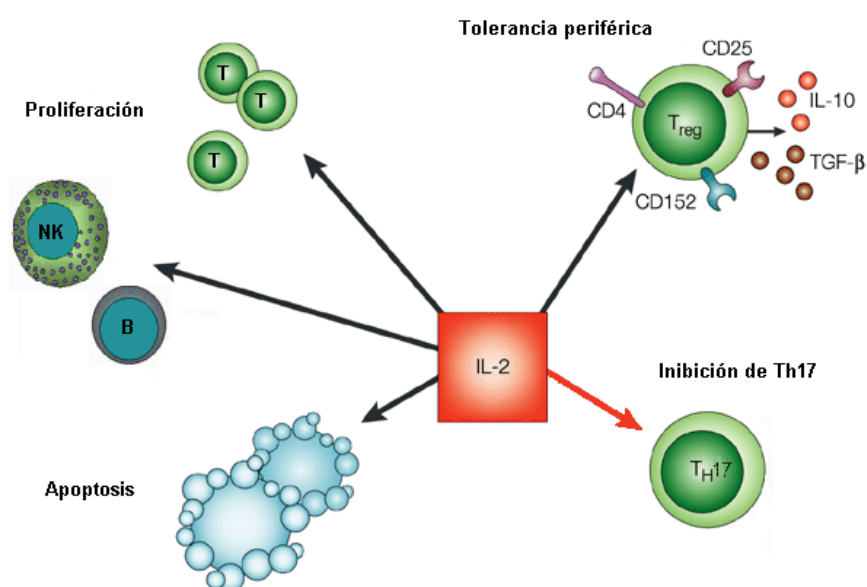
ICSBP, "IFN-consensus sequence-binding protein"; IKKs, "I-κb kinases"; IRAK, "IL-1 receptor-associated kinase"; LBP, "lipopolysaccharide binding protein"; LPS, "lipopolysaccharide"; MD2, "myeloid differentiation protein-2"; MyD88, "myeloid differentiation primary response"; STAT, "signal transducer and activator of transcript"; TIFA, "TRAF-interacting protein with a forkhead-associated domain"; TIRAP, "TIR domain-containing adapter protein"; Tollip, "toll interacting protein".

Varios polimorfismos localizados en la región 3p21, donde se localiza el gen *MST1* y su receptor *MST1R*, entre otros genes, se han encontrado asociados tanto a la EC como a la CU (50, 121, 122). Para determinar el papel de esta región en las distintas formas clínicas de la enfermedad inflamatoria intestinal, decidimos analizar tres polimorfismos, dos de ellos asociados a la EII previamente y considerados como señales independientes, y el tercero seleccionado con el fin de recoger una mayor variabilidad de la región.

- **IL2, IL2RA e IL2RB:** La interleuquina-2 es una glicoproteína producida principalmente por células T CD4 y en menor medida por CD8, tras ser activadas por antígenos. El receptor de IL-2 está formado por tres proteínas asociadas de forma no covalente denominadas IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  y  $\gamma$ c. Las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$ c son comunes a otros receptores

de citoquinas y forman el receptor de afinidad intermedia de IL-2 que se expresa en células T en reposo. La cadena  $\alpha$  es específica de este receptor y se produce cuando la célula T es activada por el antígeno, formando el receptor de alta afinidad junto con las otras dos subunidades.

Tradicionalmente, IL-2 ha sido considerada un factor de crecimiento esencial para los linfocitos T. Esta función ha sido firmemente establecida “in vitro”, pero es menos obvia “in vivo” debido a que su función es redundante con la de otras citoquinas. De hecho, los ratones que carecen de IL-2 o de las cadenas  $\alpha$  o  $\beta$  del receptor, desarrollan un desorden linfoproliferativo y muestran signos de autoinmunidad (123, 124). La principal función no redundante de esta citoquina parece ser la regulación de la tolerancia periférica por estimulación de la supervivencia y función de las células T reguladoras (125-128). IL-2 también estimula el crecimiento y la función de otras células inmunes como linfocitos B y NK, potencia la muerte por apoptosis de los linfocitos T activados e interfiere con la diferenciación de las células Th17 (129).



**Figura 9.** Acciones llevadas a cabo por IL-2 (figura adaptada de JJ O'Shea et al (130)).



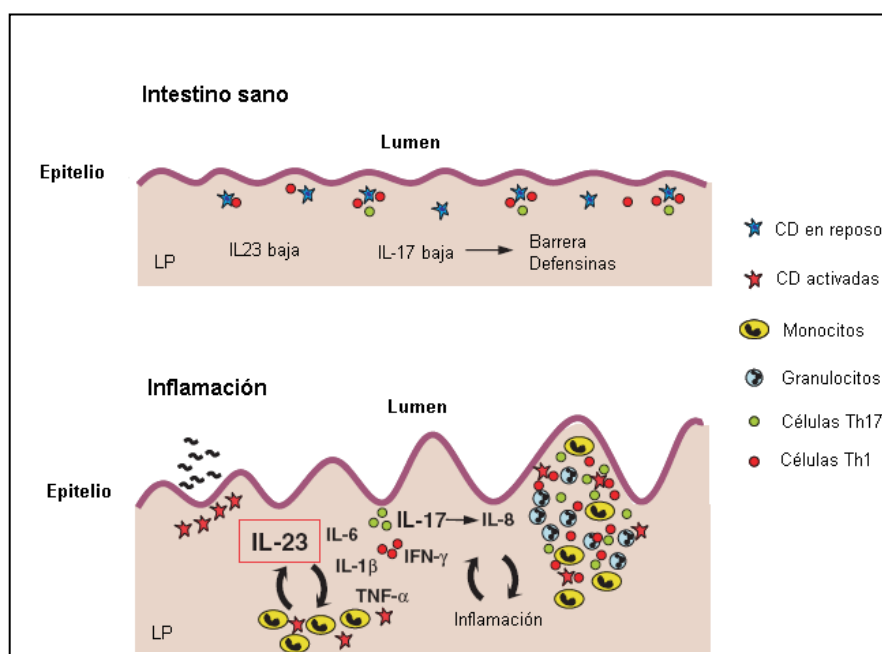
El gen *IL2* se localiza en un bloque de desequilibrio de ligamiento situado en el cromosoma 4q27 que incluye otros genes como *KIAA1109*, *TENR* (“testis nuclear RNA binding protein”) e *IL-21*. El gen *IL2RA* está localizado en la región 10p15 junto a los genes *RBM17* (“RNA-binding motif protein 17”), en el mismo bloque de DL, e *IL15RA*, en otro bloque. El gen *IL2RB* se encuentra en la región cromosómica 22q13. Estos tres genes se han encontrado asociados a diversas patologías autoinmunes, concretamente enfermedad celiaca, diabetes tipo 1, artritis reumatoide y esclerosis múltiple, en estudios de barrido genómico (50, 91, 131).

Por su función y su asociación a otras enfermedades autoinmunes consideramos que estos genes son buenos candidatos para ser objeto de nuestro estudio por lo que nos planteamos estudiar por primera vez su papel en la susceptibilidad a padecer EII. Para ello tipamos ocho SNPs, tres en *IL2*, tres en *IL2RA* y dos en *IL2RB*, previamente asociados a otras enfermedades.

- ***IL23R* e *IL12B***: El gen *IL23R* codifica la subunidad específica del receptor de IL-23, el cual presenta además otra subunidad llamada IL-12R $\beta$ 1, que comparte con el receptor de IL-12. El gen *IL12B* codifica la subunidad p40 que es común a IL-23 e IL-12. Además de esta cadena común, cada una de estas citoquinas tiene una cadena específica, p19 en el caso de IL-23 y p35 en el caso de IL-12.

IL-23 es producida por células presentadoras de antígeno y promueve la expansión y supervivencia de las células Th17, una población de células T que produce citoquinas inflamatorias como IL-17, TNF e IL-6 (132). Datos procedentes de estudios llevados a cabo con células Th17 humanas, sugieren que IL-23 es responsable de algunas funciones biológicas atribuidas inicialmente a IL-12. Existen evidencias de que el eje IL-23/IL-17 participa en la homeostasis intestinal, aunque las acciones precisas de estas citoquinas no se conocen. Por ejemplo, en ratones sanos, IL-23 se expresa constitutivamente por las células dendríticas de la lámina propia en el ileon terminal (133) y la frecuencia de células Th17 en la lámina propia intestinal es marcadamente más alta que su frecuencia en el tejido linfoide periférico (134). Lógicamente, a pesar de su papel patogénico en la EII, IL-23 tiene importantes efectos inmunoprotectores en el intestino, así los ratones IL-23<sup>-/-</sup> presentan un aumento de la susceptibilidad frente a patógenos bacterianos intestinales (135). Además, IL-17 puede tener algunas

funciones protectoras en la capa epitelial ya que se ha visto que fortalece las uniones entre las células epiteliales “in vitro” (136). Por otro lado, estudios en modelos murinos de enfermedades autoinmunes indican que IL-23 juega un papel crítico en dichas enfermedades, correlacionado con un aumento de las células Th17 en tejidos inflamados (137, 138). Se ha observado también que la expresión del ARNm de la subunidad IL-23p19 se encuentra elevada en biopsias procedentes de áreas inflamadas de pacientes de Crohn (139).



**Figura 10.** Papel de IL-23 en el intestino sano e inflamado (figura adaptada de KJ Maloy et al (140)).  
LP, lámina propia.

*IL23R*, localizado en la región 1p31, es otro de los genes que se han encontrado asociados a la enfermedad inflamatoria intestinal a través de estudios de asociación por barrido genómico. El primer estudio que implicó este gen en la EII describió dos polimorfismos asociados a Crohn y colitis, uno de ellos no sinónimo, que parecían ser señales independientes (51). Un estudio publicado en el año 2004 encontró un polimorfismo localizado en la región 3' UTR del gen *IL12B* que se correlacionaba con

un aumento en la secreción de IL-12, pero este SNP y otros localizados en ese gen, no mostraban asociación con la enfermedad de Crohn (141). En los primeros estudios de barrido genómico realizados en la enfermedad de Crohn, el gen *IL12B* no apareció asociado a la enfermedad. Posteriormente un estudio (116), cuyo objetivo era analizar regiones que habían mostrado una cierta asociación con Crohn en los estudios iniciales, encontró un SNP, diferente al descrito inicialmente, asociado a la EC.

Para dilucidar el papel de estos genes en la enfermedad inflamatoria intestinal y tratar de esclarecer si el SNP sinónimo es el responsable del efecto observado, decidimos analizar los dos polimorfismos localizados en el gen *IL23R* previamente asociados a la enfermedad de Crohn y considerados señales independientes y en cuanto al gen *IL12B*, analizamos los dos polimorfismos descritos previamente.

Los estímulos que llegan a las células se transmiten a través de cascadas de señalización en las que juegan un papel fundamental, como diana final, los factores de transcripción. Estos son capaces de reconocer secuencias específicas de ADN en la región reguladora de los genes modulando, positiva o negativamente, la expresión y la subsiguiente producción de la proteína codificada por el gen en cuestión. En este trabajo hemos analizado varios factores de transcripción que están implicados de alguna manera en la respuesta inmune.

- ❑ **NKX2-3** ("NK2 transcription factor related, locus 3"): pertenece a una familia de factores de transcripción llamada NKX que se caracteriza por contener homeodominios, que son dominios de unión al ADN con una secuencia muy conservada. La inactivación del gen *Nkx2-3* en ratones da lugar a alteraciones morfológicas severas del intestino y del bazo y letalidad postnatal temprana en la mayoría de los homocigotos mutantes. Además, la formación de vellosidades en el intestino delgado se encuentra considerablemente retrasada debido a una reducción de la proliferación del epitelio (142). Por otro lado, en este tipo de estudios se ha observado que NKX2-3 tiene un papel en la localización correcta de los linfocitos en el bazo en las respuestas inmunes dependientes de células B y T (143).

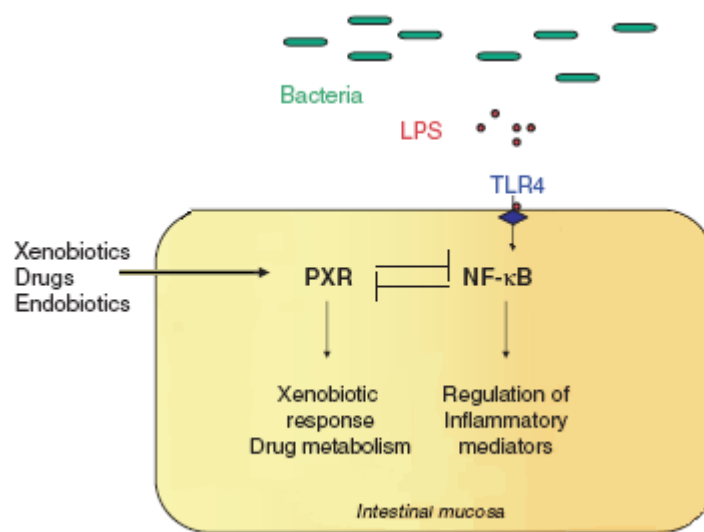
Este gen se vió asociado a la enfermedad de Crohn en un estudio de barrido genómico realizado en diferentes enfermedades autoinmunes (50). Nos propusimos analizar el papel de este gen en la enfermedad inflamatoria intestinal en nuestra población, para lo

cual estudiamos el polimorfismo inicialmente asociado a la EC y otra variante con el fin de recoger una mayor variabilidad del gen.

- **PXR** (“pregnane X receptor”): es un factor de transcripción activado por ligando que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares (NR) que engloba a los receptores de esteroides, retinoides, hormonas tiroideas y muchos receptores “huérfanos”. La función de PXR es regular el sistema de respuesta a xenobióticos para prevenir la acumulación tóxica de estas sustancias en el interior de las células. PXR es activado por un amplio rango de sustancias tanto endógenas como exógenas, incluyendo ácidos biliares, esteroides, antibióticos y una gran variedad de drogas. Una vez activado se une al receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR) formando un heterodímero que se dirige al núcleo donde interacciona con elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) localizados en la región promotora de múltiples genes, que participan en diferentes aspectos del metabolismo de xenobióticos (oxidación, conjugación y transporte). Algunos de estos genes son los de la familia *CYP3A* (subfamilia del citocromo P450) y *ABCB1/MDR1* (“ATP-binding cassette, sub-family B, member 1”/“multidrug resistance protein 1”).

Diversos estudios llevados a cabo con modelos animales de colitis y pacientes de EII sugieren que un proceso de detoxificación adecuado es crítico para preservar la integridad de la barrera intestinal. Hay evidencias de que en la enfermedad inflamatoria intestinal existe una desregulación de la respuesta a xenobióticos, así, los ratones “knockout” para *Gpx1*, *Gpx2* (codifican la glutathion peroxidasa) y *mdr1a* desarrollan colitis ulcerosa (144, 145). Además varios polimorfismos localizados en el gen *ABCB1/MDR1* se han asociado a colitis ulcerosa (146) y enfermedad de Crohn (147). Estudios de expresión génica en humanos también han implicado la respuesta a xenobióticos en la patofisiología de la EII. Específicamente, se ha visto que la expresión de algunos genes involucrados en procesos de detoxificación celular y defensa, incluyendo *PXR*, está disminuida en pacientes con CU (148). Por otro lado, se ha observado que ratones “knockout” para *PXR* presentan un aumento de la expresión de genes regulados por NF- $\kappa$ B así como un aumento de la inflamación intestinal, sugiriendo una interacción funcional entre las vías de *PXR* y NF- $\kappa$ B (149). Además, la activación de NF- $\kappa$ B inhibe la función de *PXR* causando una reducción de la expresión de sus genes diana. Esta interrelación negativa entre NF- $\kappa$ B y *PXR* explica los efectos

inmunosupresores que tienen los ligandos de este último. De esta manera, PXR puede funcionar como un represor de la inflamación y la inmunidad.

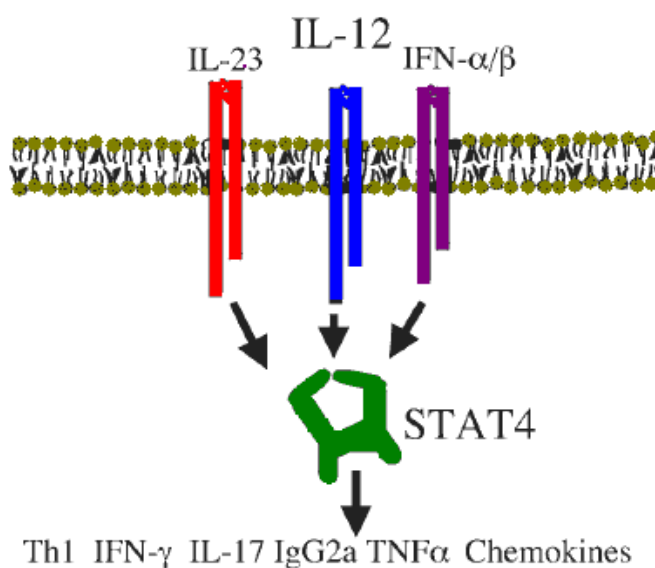


**Figura 11.** Interrelación entre PXR y NF-κB (figura adaptada de W. Wahli (150)).

El gen *PXR* fue implicado en la EII, tanto en Crohn como en colitis, en un estudio de asociación publicado en el año 2006 (151). Sin embargo, un estudio posterior no replicó dicha asociación (152). Con el fin de dirimir esta discrepancia y comprobar si este gen está involucrado en la EII, analizamos tres de los polimorfismos descritos en el estudio inicial.

- **STAT4** (“signal transducer and activator of transcription 4”): La vía de señalización JAK/STAT es utilizada por los receptores de citoquinas de tipo I y II. Las proteínas JAKs (“Janus kinases”) son una familia de tirosín kinasas, asociadas a la cola citoplasmica de este tipo de receptores, que se activan tras la unión de la citoquina específica y la subsecuente dimerización del receptor. Cuando se activan fosforilan a los receptores de citoquinas permitiendo la unión de las proteínas STATs. Estas, una vez acopladas, son también fosforiladas por las proteínas JAKs provocando su

dimerización y translocación al núcleo. STAT-4 se activa en linfocitos T CD4, en respuesta a IL-12 principalmente, y es requerida para la transducción de señales procedentes de varias citoquinas proinflamatorias tales como IL-12, IL-15 e IL-23. Por lo tanto, es crucial en la polarización y perpetuación de las respuestas inmunes tipo Th1. Además, STAT4 ha sido implicado en el desarrollo de las células Th17 (153), que como se mencionó anteriormente desempeñan un papel muy importante en la inflamación.



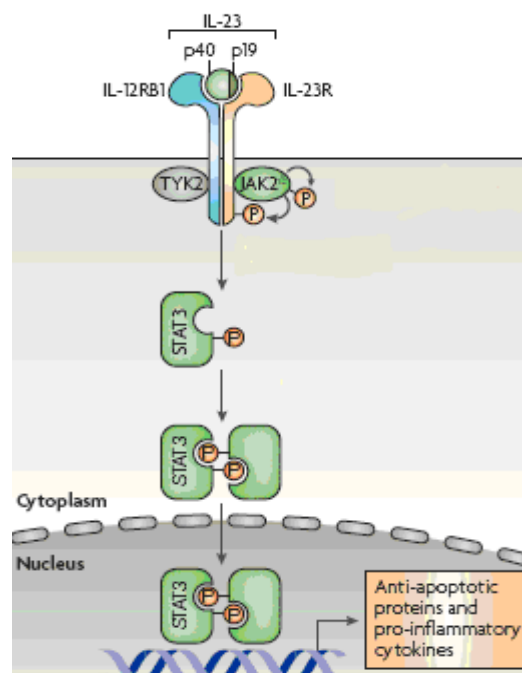
**Figura 12.** Señalización mediada por STAT4 (figura adaptada de M.H. Kaplan (154)).

Un estudio reciente ha implicado el gen *STAT4* en la susceptibilidad a padecer artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico (155). Este gen se localiza en la región cromosómica 2q33, donde también se encuentran otros doce genes candidatos. En este estudio se realizó un mapeo fino de la región que permitió la identificación de cuatro SNPs asociados a AR en fuerte desequilibrio de ligamiento, localizados en el tercer intrón del gen *STAT4*.

El importante papel que desempeña este gen en la inflamación, además del hecho de que se haya asociado a otras patologías autoinmunes, lo hace un buen candidato para

ser estudiado en la enfermedad inflamatoria intestinal y concretamente, analizamos el polimorfismo asociado a AR para esclarecer por primera vez su acción en la predisposición a padecer EII.

- ❑ **STAT3** ("signal transducer and activator of transcription 3"): *STAT3* es activado por una amplia variedad de citoquinas y factores de crecimiento. Este factor de transcripción induce la expresión de varios genes que codifican moléculas que participan en una variedad de funciones biológicas, tales como crecimiento celular, apoptosis, motilidad celular, inhibición de la producción de citoquinas, producción de citoquinas reguladoras y actividad antibacteriana, dependiendo del tipo celular en que se exprese. *STAT3* parece ser crítico en la modulación del balance entre células Th17 y células Treg, así como en promover la proliferación de las células T CD4+. Se ha observado que este factor de transcripción se une a múltiples genes involucrados en la diferenciación, activación, proliferación y supervivencia de las células Th17, regulando tanto la expresión como las modificaciones epigenéticas (156).



**Figura 13.** Señalización mediada por STAT3 (figura obtenida de J.H. Cho (7)).  
Tyk, "tyrosine kinase".

Al igual que en otras ocasiones, la implicación de este gen en la enfermedad de Crohn se describió por primera vez en un estudio de barrido genómico (50) y posteriormente se ha replicado en numerosas ocasiones. Ya que ninguno de los SNPs asociados se considera etiológico, decidimos analizar varios polimorfismos localizados en esta región cromosómica con el fin de formar haplotipos y aportar información adicional a dicha asociación.





## **2. OBJETIVOS**

---



Nuestro propósito en este estudio fue la identificación de nuevos marcadores genéticos de susceptibilidad a la enfermedad inflamatoria intestinal en la población española, para lo cual nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Analizar varios polimorfismos de un solo nucleótido (especificados en el apartado de materiales y métodos), localizados en regiones o genes candidatos a conferir susceptibilidad a la enfermedad inflamatoria intestinal bien por su implicación en otras enfermedades autoinmunes, por su función o por su asociación previa con la EII, en nuestra muestra de pacientes de colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn y compararlos con controles sanos.
2. Analizar los haplotipos conformados por los marcadores estudiados con el fin de aportar información adicional a la obtenida con el estudio individual de cada uno de ellos.
3. Realizar un análisis estratificado de los enfermos atendiendo a las formas clínicas que presentan y al género, para determinar si existe una asociación específica con un subgrupo determinado de pacientes.
4. Estudiar la posible relación entre los genes estudiados y los principales factores de susceptibilidad descritos para la enfermedad de Crohn (*NOD2*) y la colitis ulcerosa (*DRB1\*0103*).
5. Analizar la existencia de interacciones epistáticas entre genes que por su función puedan estar relacionados.



### **3. PACIENTES Y MÉTODOS**

---



### 3.1 Muestras analizadas

*Enfermos:* para la realización de este trabajo se analizaron un total de 869 enfermos españoles de raza blanca, 416 con enfermedad de Crohn y 453 con colitis ulcerosa, todos ellos diagnosticados en el Servicio de Gastroenterología del Hospital Clínico San Carlos basándose en criterios clínicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos (157). La distribución de los pacientes con CU y EC, es la siguiente:

	Género	Extensión
Colitis ulcerosa	Mujeres: 40% Hombres: 60%	CU extensa: 43% CU izquierda: 57%

	Género	Localización	Comportamiento
Enfermedad de Crohn	Mujeres: 51% Hombres: 49%	Ileal (L1): 48% Colónico (L2): 16% Ileocolónico (L3): 32% TD superior (L4): 3%	Inflamatorio (B1): 43% Estenosante (B2): 15% Fistulizante (B3): 42%

*Controles:* En los análisis iniciales se incluyeron 560 sujetos como grupo control; esta muestra fue posteriormente aumentada hasta un total de 808 individuos. En casos particulares, se analizó una muestra adicional de controles consistente en 180 individuos. Todos ellos eran sujetos sanos caucásicos, no emparentados entre sí, procedentes de la misma población que los pacientes y obtenidos principalmente de donantes de sangre y personal del laboratorio sin antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes.

Además del incremento secuencial del número de pacientes y controles, el número de muestras analizadas fluctúa entre un marcador y otro debido a la diferencia en el éxito del genotipado, que siempre se mantiene por encima del 95% de la muestra empleada.

Todos los sujetos incluidos en el trabajo firmaron un consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Clínico San Carlos.



## 3.2 Métodos empleados en el análisis

### 3.2.1 *Aislamiento de ADN a partir de sangre periférica*

Obtuvimos el ADN a partir de los leucocitos contenidos en una muestra de 10 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA. Algunas muestras se aislaron por la técnica de precipitación salina (“salting-out”) y otras mediante el robot de aislamiento de ácidos nucleicos MagNA Pure Compact (Roche). A continuación se detallan ambos procedimientos:

#### ☐ Precipitación salina

- Se lisan los hematíes, para lo cual se añade STMT en una proporción 1:1, a 4°C durante 5 minutos. Pasado este tiempo se centrifuga la sangre durante 30 minutos a 3500 r.p.m. y a 4°C.
- Se decanta el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 10 ml de STMT, y se centrifuga de nuevo durante 30 min a 3500 r.p.m. y a 4°C.
- Se decanta el sobrenadante repitiendo la operación hasta que el sedimento quede limpio.
- Se resuspende el “pellet” en 4,5 ml de “buffer” B y se añaden 50 µl de proteinasa K (20 mg/ml), 125 µl de SDS (20%) y 325 µl de agua, para romper las proteínas que están unidas al ADN.
- Se incuba en un baño a 37°C en agitación durante toda la noche. Si pasado este tiempo siguen quedando partículas en suspensión se vuelve a añadir proteinasa K y se incuba 1 ó 2 horas a 55°C.
- A continuación, se añaden 2 ml de NaCl 6M para precipitar los péptidos y se mezcla en el vórtex. Se centrifuga a 3500 r.p.m. a 4°C.
- Se recoge el sobrenadante y se precipita el ADN con isopropanol en una proporción 1:1, mezclándolo por inmersión hasta que se forme una “medusa” compacta.
- Se recoge la “medusa” y se pone en un eppendorf con 1 ml de etanol al 70%.
- Por último, se seca el ADN y se resuspende en 600 µl de “buffer” Tris-EDTA.

#### ☐ Robot MagNA Pure Compact:

- Se agitan los cartuchos de reactivos, uno por cada muestra, y se introducen en la gradilla correspondiente previa lectura del código de barras que presentan. En estos

cartuchos encontramos 11 pocillos con distintos reactivos (pocillo 1: proteinasa K, pocillos 2 y 3: buffer de lisis, pocillos 4 y 5: partículas de cristal magnéticas, pocillo 6: isopropanol, pocillos 7 y 8: buffer de lavado, pocillos 9 y 10: buffer de lavado, pocillo 11: buffer de elución).

- Se selecciona, en el menú de protocolos del robot, el protocolo de purificación apropiado (DNA\_Blood\_1000) y el volumen de elución (200 µl).
- Se insertan las puntas, una por cada purificación, en la posición asignada en la gradilla de puntas del instrumento.
- Se pone 1 ml de cada muestra de sangre en los tubos disponibles para ello y se introducen en el lugar apropiado de la gradilla de muestras.
- Se identifican los tubos de elución mediante la lectura del código de barras y se insertan en la gradilla de muestras.
- Se inicia el procedimiento.

### **3.2.2      *Cuantificación del ADN y estimación de su pureza***

La cuantificación del ADN obtenido se realiza por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm que es la longitud de onda a la que absorbe el ADN. Para determinar la pureza del ADN, ya que pueden quedar restos de proteína, se realiza el cociente entre la absorbancia a 260nm y la absorbancia a 280 nm (longitud de onda a la que absorben las proteínas) considerando como válido un valor comprendido entre 1.7 y 1.8.

La concentración del ADN obtenido se calcula multiplicando el valor de absorbancia por 50, ya que cada unidad de densidad óptica (DO) corresponde a 50ng/µl de ADN.

Por último, se diluye cada muestra con agua destilada para obtener una concentración final de 10ng/µl. Estas serán las diluciones de trabajo utilizadas para los análisis posteriores.

### **3.2.3 Tipaje de HLA de clase II**

El tipaje de los “loci” de clase II, *DRB1*, *DQA1* y *DQB1*, se llevo a cabo mediante PCR-SSOP (“Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Oligonucleotide Probe”). Este método consiste en la amplificación de la región que nos interesa mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR); concretamente amplificamos el segundo exón de cada uno de estos genes ya que es donde se concentra la variabilidad. Una vez terminada la PCR se realiza una electroforesis en gel de agarosa para comprobar que la amplificación se ha realizado correctamente. A continuación, se transfiere el producto de la amplificación a una membrana de nylon mediante “Dot-Blot” y se realiza una hibridación con sondas oligonucleotídicas específicas marcadas en 3’ con digoxigenina. Tras añadir un anticuerpo anti-digoxigenina unido a una enzima y un sustrato quimioluminiscente, se realiza el revelado en placa fotográfica.

De esta manera determinamos qué enfermos de colitis ulcerosa presentan el alelo de riesgo *DRB1\*0103*, lo que nos permitirá posteriormente estratificar a estos pacientes según presenten o no dicho alelo para comprobar si existe interacción con los genes analizados en este estudio.

### **3.2.4 Tipaje de polimorfismos en genes candidatos**

#### **□ Polimorfismos de un solo nucleótido**

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) son variaciones de una sola base que aparecen en la secuencia del ADN entre individuos de una población y que deben darse en al menos el 1% de la población para ser consideradas como tales. Están presentes en el genoma humano con una frecuencia de uno por cada 1.000 pares de bases. El estudio de estos polimorfismos está siendo de gran interés por el papel que juegan como marcadores de la susceptibilidad a diversas enfermedades.

En este estudio el análisis de los polimorfismos se llevo a cabo mediante PCR a tiempo real utilizando sondas TaqMan (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). Para ello, además de los dos cebadores necesarios para amplificar el fragmento que contiene el polimorfismo de interés, se añaden dos sondas u oligonucleótidos específicos de alelo. Cada una de estas sondas está marcada en el extremo 5’ con un fluorocromo diferente, generalmente FAM (6-carboxifluoresceína) y VIC (4, 7, 2’, 4’, 5’, 7’-hexafluoro-6-carboxifluoresceína), y en el extremo 3’ llevan una molécula captadora o “quencher” que

secuestra la fluorescencia emitida por el marcador fluorescente. Cuando está presente su alelo, la sonda se une al ADN entre los dos cebadores utilizados en la PCR. La Taq polimerasa realiza la elongación en sentido 5'→ 3' y cuando llega al punto donde está unida la sonda, la actividad exonucleasa 5'→ 3' de la enzima degrada la sonda, liberando al fluorocromo de la actividad secuestradora del “quencher”, lo que permite detectar la señal emitida.

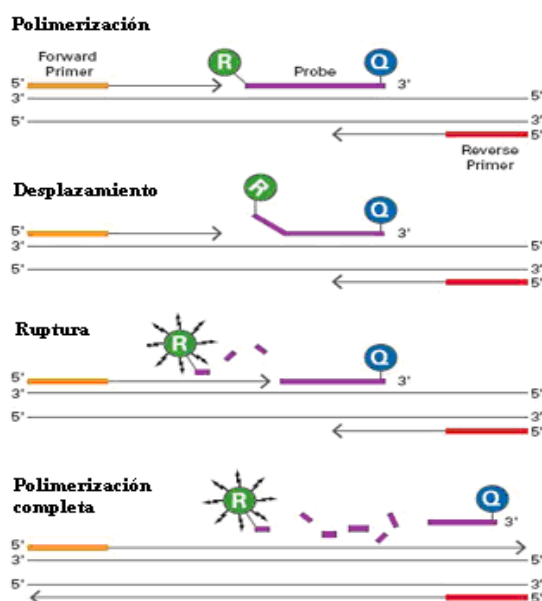
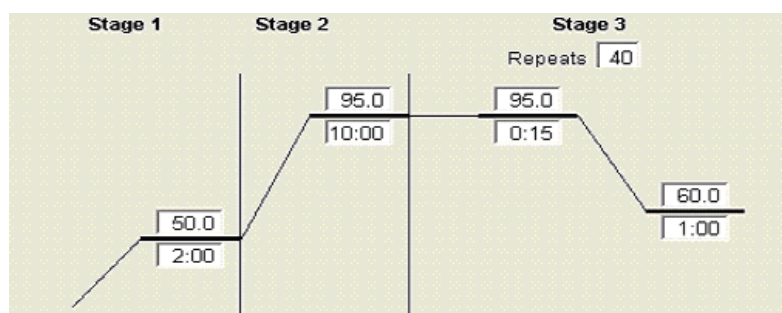


Figura 14. Mecanismo de acción de las sondas TaqMan.

Esta técnica presenta una elevada especificidad y es eficaz para la discriminación alélica. La comercialización de ensayos puestos a punto en unas condiciones estandarizadas, hace que el genotipado de un elevado número de muestras sea relativamente rápido y sencillo, aumentando así la calidad y la fiabilidad de los estudios.

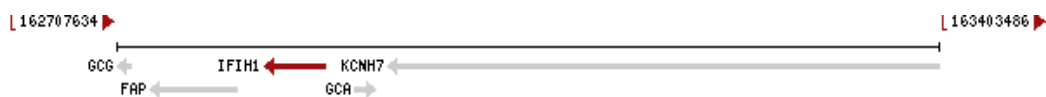
Todos los polimorfismos incluidos en este trabajo se analizaron mediante ensayos TaqMan y el genotipado se realizó en un equipo 7900HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) en tres etapas: descontaminación con Amperasa uracil-N-glucosilasa (50° C, 2 min), activación de la polimerasa (95° C, 10 min) y una última etapa de 40 ciclos de amplificación consistentes en la desnaturalización (95° C, 15 s) e hibridación de primers-extensión (60° C, 1 min).



**Figura 15.** Condiciones estándar de la PCR utilizada para el tipaje de polimorfismos de un solo nucleótido mediante sondas TaqMan.

□ Polimorfismos analizados en genes candidatos

○ ***IFIH1* (MDA5): región 2q24**



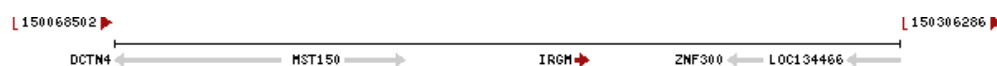
- rs2068330: intron 13 del gen *KCNH7*. Cambio G/C.
- rs1990760: exón 15 del gen *IFIH1*. Cambio A/G. Es un polimorfismo no sinónimo que da lugar al cambio Ala946Thr.
- rs2111485: localizado entre los genes *FAP* e *IFIH1*. Cambio C/T.
- rs13422767: región promotora del gen *FAP*. Cambio G/A.

○ ***CLEC16A* (KIAA0305): región 16p13**



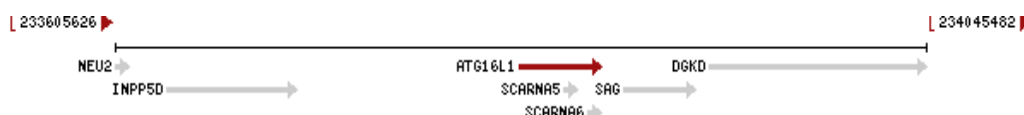
- rs2903692: intron 21 del gen *CLEC16A*. Cambio G/A.
- rs6498169: intron 21 del gen *CLEC16A*. Cambio A/G.

○ ***IRGM*: región 5q33**



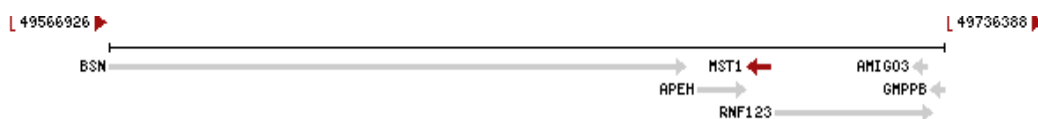
- rs10065172: localizado en el único exón del gen *IRGM*. Cambio C/T.
- rs4958847: próximo al extremo 3' del gen *IRGM*. Cambio G/A.

○ ***ATG16L1*: región 2q37**



- rs2241880: exón 8 del gen *ATG16L1*. Cambio G/A. Es un polimorfismo no sinónimo que da lugar al cambio Thr300Ala.

○ ***MST1 (MSP)*: región 3p21**



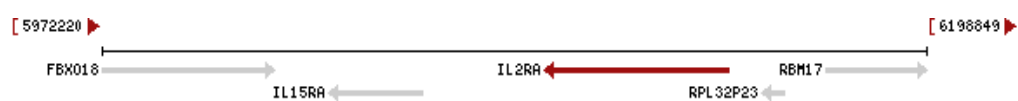
- rs9858542: exón 9 del gen *BSN*. Cambio G/A. Es un polimorfismo sinónimo que da lugar al cambio Thr3912Thr.
- rs2131109: intrón 11 del gen *BSN*. Cambio C/T.
- rs2271961: intron 8 del gen *TRAIP*. Cambio T/C.

○ ***IL2*: región 4q27**



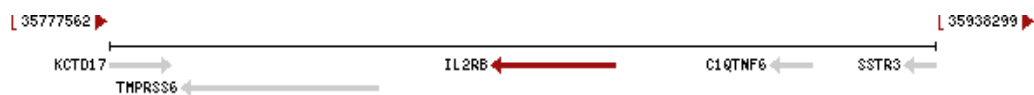
- rs11938795: próximo al extremo 5' del gen *KIAA1109*. Cambio T/C.
- rs17388568: intrón 8 del gen *ADAD1*. Cambio G/A.
- rs6822844: localizado entre los genes *IL2* e *IL21*. Cambio G/T.

○ ***IL2RA* (*CD25*): región 10p15**



- rs2104286: intrón 1 del gen *IL2RA*. Cambio T/C.
- rs41295061: localizado entre los genes *IL2RA* y *RBM17*. Cambio A/C.
- rs11594656: localizado en la región promotora del gen *RBM17*. Cambio T/A.

○ ***IL2RB*: región 22q13**



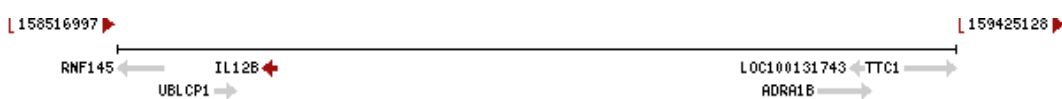
- rs743777: región promotora del gen *IL2RB*. Cambio A/G.
- rs9622555: región promotora del gen *IL2RB*. Cambio G/T.

○ ***IL23R***: región 1p31



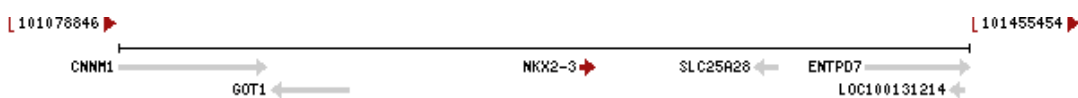
- rs7517847: intron 6 del gen *IL23R*. Cambio T/G.
- rs11209026: exón 9 del gen *IL23R*. Cambio G/A. Es un polimorfismo no sinónimo que da lugar al cambio de Arg381Gln.

○ ***IL12B***: región 5q33



- rs3212227: región 3' UTR del gen *IL12B*. Cambio T/G.
- rs6887695: próximo al extremo 5' del gen *IL12B*. Cambio G/C.

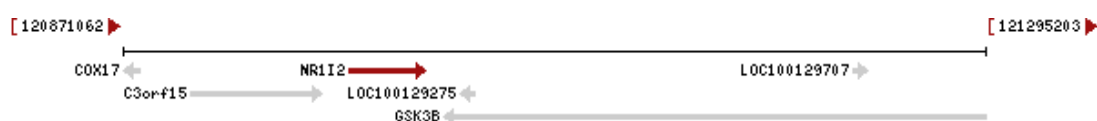
○ ***NKX2-3***: región 10q24



- rs10883365: región promotora del gen *NKX2-3*. Cambio A/G.
- rs888208: región 3' UTR del gen *NKX2-3*. Cambio A/G.

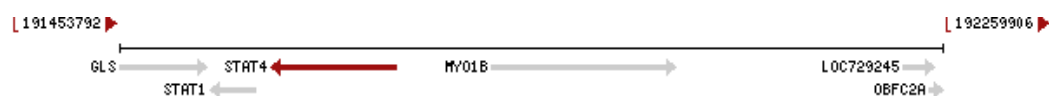


○ **PXR (NR1I2): región 3q13**



- rs3814055: región promotora del gen *NR1I2*. Cambio C/T.
- rs6784598: intron 5 del gen *NR1I2*. Cambio C/G.
- rs2276707: intron 6 del gen *NR1I2*. Cambio C/T.

○ **STAT4: región 2q32**



- rs7574865: intron 3 del gen *STAT4*. Cambio G/T.

○ **STAT3: región 17q21**



- rs12948909: intron 1 del gen *PTRF*. Cambio A/C.
- rs1026916: intron 1 del gen *STAT3*. Cambio G/A.
- rs744166: intron 1 del gen *STAT3*. Cambio A/G.
- rs3809758: intron 21 del gen *STAT3*. Cambio C/T.

### 3.2.5 Estudios realizados y análisis estadístico

#### □ Equilibrio de Hardy-Weinberg

En los estudios de asociación es importante comprobar que no exista una desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg ya que ésta puede ser debida, entre otras causas, a que la población está estratificada, es decir, existen subgrupos dentro de ésta. Además, ésta es una forma de comprobar si se ha realizado correctamente el genotipado, ya que, en ocasiones un error en el tipaje puede causar una desviación del equilibrio. Este estudio se realiza en el grupo control, ya que en los enfermos el desequilibrio puede deberse a que existe una asociación con la enfermedad. En este trabajo utilizamos un test  $\chi^2$  para comparar las frecuencias observadas con las esperadas según el equilibrio de Hardy-Weinberg.

#### □ Estudio caso-control

Las frecuencias fenotípicas y genotípicas en pacientes y controles fueron comparadas utilizando un test  $\chi^2$  o un test exacto de Fisher, en el caso de que un valor esperado resultara inferior a 5. En este tipo de estudios el efecto se mide mediante la “odds ratio” (OR) que es la razón de dos cocientes: el número de pacientes portadores del alelo de riesgo entre el número de pacientes no portadores y el número de controles portadores del alelo de riesgo entre el número de controles no portadores. Los intervalos de confianza al 95% fueron estimados con el método de Cornfield. Este análisis se realizó mediante el paquete estadístico estándar EpiInfo v. 6.02 (World Health Organization, Genova, Suiza).

Tanto los enfermos de Crohn como los de colitis fueron estratificados por género y formas clínicas. Los enfermos se dividieron en hombres y mujeres y se compararon las frecuencias genotípicas y alélicas entre ambos grupos. Cuando encontramos una diferencia estadísticamente significativa, cada grupo fue comparado con controles. Además, los enfermos de Crohn fueron clasificados de acuerdo a la localización en ileales más ileocolónicos (L1+L3) y en colónicos puros (L2), y según el comportamiento en inflamatorio (B1), estenosante (B2) y fistulizante (B3). Los enfermos de colitis fueron clasificados en colitis extensa y colitis izquierda. Igualmente las frecuencias se compararon entre los distintos grupos y en el caso de encontrar una diferencia significativa, cada grupo se comparó con los controles. Todas las comparaciones se realizaron mediante un test  $\chi^2$  (EpiInfo v. 6.02). En este trabajo los valores de p se muestran sin corregir, ya que consideramos que la corrección de Bonferroni no sería adecuada debido a que las comparaciones que realizamos a menudo no son independientes y a que, en la mayoría de los casos, se trata de estudios de replicación, por tanto exentos de

corrección.

□ Interacción epistática

El hecho de que los distintos genes que se han encontrado asociados a la enfermedad inflamatoria intestinal no expliquen completamente el componente genético de la misma podría indicar la existencia de interacciones gen-gen. Si existe una interacción epistática entre dos genes, el efecto de un “locus” se verá alterado o enmascarado por el otro “locus”, de manera que la capacidad para detectar el efecto producido por el primero estará disminuida. A lo largo de este trabajo analizaremos la existencia de interacciones epistáticas entre genes que están relacionados funcionalmente. Para ello clasificamos a los enfermos en tres grupos, según el genotipo que presenten en un determinado polimorfismo, y comparamos entre ellos, mediante un test  $\chi^2$ , la distribución genotípica, alélica o de portadores (según proceda) del otro polimorfismo.

Relacionado con el concepto de interacción epistática estaría la estratificación de los enfermos de Crohn según la presencia o ausencia de mutaciones en el gen de susceptibilidad *CARD15*, así como la estratificación de los enfermos de colitis en base a la presencia o ausencia del alelo de riesgo *DRB1\*0103*, que analizaremos para todos los polimorfismos estudiados en este trabajo. La estratificación por *CARD15* la llevamos a cabo comprobando si el efecto conferido por otros polimorfismos varía en función de la presencia de alguna de las mutaciones localizadas en este gen (G908R, R702W y L1007fs). Para ello clasificamos a los enfermos de Crohn en *CARD15*- (no presentan ninguna mutación en este gen) y *CARD15*+ (heterocigotos para alguna de estas tres mutaciones, homocigotos o heterocigotos compuestos). En el caso de la estratificación por el alelo *DRB1\*0103* dividimos a los enfermos de colitis según sean portadores (*DRB1\*0103*+) o no (*DRB1\*0103*-) de este alelo. En ambos casos comparamos, mediante un test  $\chi^2$  (EpiInfo v. 6.02), la distribución genotípica, alélica o de portadores de cada polimorfismo entre los distintos grupos establecidos. En este análisis estratificado podemos interpretar los datos de dos formas: como una interacción epistática, cuando el polimorfismo solo tiene efecto en los enfermos *CARD15*+ o *DRB1\*0103*+ o como un indicador de la existencia de subgrupos dentro de los enfermos, desde el punto de vista genético, cuando el polimorfismo solo tiene efecto en los enfermos *CARD15*- o *DRB1\*0103*-.

Tanto en el análisis de interacciones como en la estratificación por el gen *CARD15* y el alelo *DRB1\*0103*, cuando encontramos una diferencia estadísticamente significativa, comparamos, utilizando un test  $\chi^2$  (EpiInfo v. 6.02), cada uno de los grupos mencionados con el

grupo control.

□ Estimación de haplotipos

Existen métodos estadísticos que permiten inferir las frecuencias haplotípicas más probables a partir del genotipo de individuos no relacionados. Esta estimación será más precisa cuanto mayor sea el desequilibrio de ligamiento entre los marcadores que se están considerando. En este estudio la estimación de haplotipos se realizó mediante el algoritmo Expectación-Maximización (EM) incluido en los “softwares” Arlequin© v2.000 y Haploview 4.1. Las frecuencias haplotípicas obtenidas para enfermos y controles fueron comparados con un test  $\chi^2$  (EpilInfo v. 6.02).

□ Desequilibrio de ligamiento

Como se mencionó en la introducción, el desequilibrio de ligamiento se define como la aparición conjunta de determinados alelos que se encuentran en distintos “loci”, con una frecuencia diferente a la esperada por azar. Para medir dicho desequilibrio utilizaremos los parámetros  $D'$  y  $r^2$  cuyos valores son calculados mediante el “software” Haploview 4.1.

El coeficiente  $D'$  de Lewontin (158) se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$D' = D/D_{\max}$$

si consideramos el haplotipo formado por los alelos a y b, tendríamos:

$$D = p(ab) - p(a) \times p(b)$$

$p(ab)$  = frecuencia observada del haplotipo

$p(a) \times p(b)$  = frecuencia esperada del haplotipo en ausencia de desequilibrio

$D_{\max}$  es el valor más alto que puede tomar  $D$ , es decir, cuando el haplotipo se presenta con una frecuencia igual a la del menos frecuente de sus componentes.

Un valor de  $D'$  igual a 1 (DL completo) indica que dos SNPs no han sido separados por recombinación, mientras que un valor de  $D'$  inferior a 1 indica una ruptura del desequilibrio de ligamiento ancestral a lo largo de la historia de la población (DL incompleto).

El coeficiente de correlación  $r^2$  (159) refleja la equivalencia genética entre

polimorfismos, lo cual es muy útil para eliminar genotipados redundantes. Además, este parámetro permite determinar si el efecto conferido por dos marcadores es independiente o no, aunque, en algunos casos, es posible que dos marcadores se encuentren en fuerte desequilibrio de ligamiento con la variante causal aún existiendo un bajo desequilibrio entre ellos. El coeficiente de correlación puede tomar valores comprendidos entre 0 y 1 y se obtiene a partir de la siguiente formula:

$$r^2 = D^2 / p(a) \times q(a) \times p(b) \times q(b)$$

$r^2$  es una medida más restrictiva que  $D'$ . Así, si el alelo de menor frecuencia de un polimorfismo está siempre asociado a uno de los dos alelos del otro SNP, el valor de  $D'$  será 1. En cambio,  $r^2$  solo será 1 si cada uno de los alelos de un SNP está en DL completo con los alelos del otro SNP. El incremento en tamaño muestral necesario para mantener la potencia estadística si se emplea un SNP marcador en lugar del polimorfismo causal es inversamente proporcional a  $r^2$ . Por ejemplo, si genotipamos un marcador que presente un  $r^2 = 0.5$  con el etiológico necesitaríamos el doble de muestras para mantener la potencia estadística.

#### □ Meta-análisis

Para llevar a cabo el meta-análisis del gen *ATG16L1* se realizó una búsqueda bilbográfica en la base de datos PubMed del NCBI ("National Center for Biotechnology Information") combinando los términos: "Crohn's disease", "ulcerative colitis", "genome-wide" y *ATG16L1* desde la publicación del primer estudio hasta el momento de la búsqueda. Adicionalmente, se realizó una búsqueda manual entre las referencias de los estudios identificados y de los artículos de revisión relevantes. Entre los resultados, seleccionamos aquellos estudios que habían genotipado el polimorfismo Thr300Ala, eran estudios caso-control en población caucásica no pediátrica y con resultados originales, no incluían muestras tipadas en otros estudios y proporcionaban suficientes datos para calcular la OR.

El meta-análisis, en este y en otros casos, fue llevado a cabo utilizando la aproximación de Mantel-Haenszel como modelo de efectos fijos y el método de DerSimonian-Laird como modelo de efectos aleatorios, incluidos ambos en el programa Review Manager 5.0 (RevMan). El sesgo de publicación fue evaluado mediante el test de Egger.

La heterogeneidad entre los estudios se analizó mediante la prueba Q de Cochran y a través del cálculo del índice  $I^2$ , el cual permite conocer cómo la posible heterogeneidad

existente puede afectar a las conclusiones del meta-análisis. Los valores de  $I^2$  del 50% o más, indican un nivel considerable de heterogeneidad. Para la prueba Q de Cochran se situó la significación estadística en  $p < 0.1$ , teniendo en cuenta su baja potencia de contraste cuando el número de estudios incluido es bajo.

Para todos los polimorfismos incluidos en este trabajo se realizaron los siguientes estudios: equilibrio de Hardy-Weinberg, análisis de haplotipos y estratificación en base a formas clínicas, género, *CARD15* y *DRB1\*0103*. Estos análisis solo serán mencionados en el apartado de resultados cuando aporten algún dato de interés para el estudio.



#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---





#### 4.1 Genes que codifican receptores de patrones moleculares asociados a patógenos: *IFIH1* y *CLEC16A*

En estas regiones analizamos seis polimorfismos, cuatro en la región 2q24, donde se localiza el gen *IFIH1*, y dos en el gen *CLEC16A*. Las frecuencias genotípicas de uno de los polimorfismos analizados en el "locus" *IFIH1* (rs13422767) no se distribuían de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg en controles ( $p < 0.05$ ), por lo que decidimos eliminarlo de los análisis posteriores.

Cuando comparamos las frecuencias genotípicas y alélicas, recogidas en la tabla 4, de los enfermos de Crohn y colitis con las de los controles no encontramos diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los marcadores analizados en ambos "loci".

**Tabla 4.** Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos analizados en los "loci" *IFIH1* y *CLEC16A* en enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y controles.

		EC	CU	Controles		EC	CU	Controles				
<i>IFIH1</i>  rs2068330   rs1990760   rs2111485   <i>CLEC16A</i> rs2903692   rs6498169	Genotipos	n (%)	n (%)	n (%)	Alelos	n (%)	n (%)	n (%)				
	GG	136 (38.9)	145 (39.9)	209 (38.5)	G	434 (62.0)	457 (63.0)	672 (61.9)				
	GC	162 (46.3)	167 (46.0)	254 (46.8)		C	266 (38.0)	269 (37.0)	414 (38.1)			
	CC	52 (14.9)	51 (14.1)	80 (14.7)	A	397 (61.7)	416 (59.9)	639 (59.1)				
	AA	124 (38.5)	126 (36.3)	191 (35.3)					G	247 (38.3)	278 (40.1)	443 (40.9)
		AG	149 (46.3)	164 (47.3)								
	GG	49 (15.2)	57 (16.4)	93 (17.2)	C	384 (60.2)	410 (58.1)	632 (60.0)				
	CC	116 (36.4)	124 (35.1)	191 (36.2)					T	254 (39.8)	296 (41.9)	422 (40.0)
		CT	152 (47.6)	162 (45.9)								
	TT	51 (16.0)	67 (19.0)	86 (16.3)	G	433 (61.9)	454 (61.9)	621 (58.4)				
GG	134 (38.3)	142 (38.7)	187 (35.2)	A					267 (38.1)	280 (38.1)	443 (41.6)	
	GA	165 (47.1)	170 (46.3)									247 (46.4)
AA	51 (14.6)	55 (15.0)	98 (18.4)	A	464 (66.7)	514 (69.6)	743 (67.8)					
	AA	159 (45.7)	181 (49.0)					258 (47.1)	G	232 (33.3)	224 (30.4)	353 (32.2)
		AG	146 (42.0)					152 (41.2)				
GG	43 (12.3)	36 (9.8)	63 (11.5)									

Asimismo, no se observaron diferencias significativas al estratificar los pacientes por formas clínicas, pero sí al hacerlo atendiendo a otros criterios como el género o la presencia/ausencia de mutaciones en el gen *NOD2/CARD15*.

La tabla 5 muestra la distribución genotípica y alélica de los tres SNPs analizados en la región *IFIH1* una vez estratificados por género. Al comparar la frecuencia del genotipo mayoritario (rs2068330\_GG, rs1990760\_AA y rs2111485\_CC) entre mujeres y hombres con colitis observamos una diferencia estadísticamente significativa que no aparecía en los enfermos de Crohn ni en los controles. Esta frecuencia estaba significativamente aumentada en el grupo de mujeres con colitis con respecto al grupo control, pero no en los hombres.

**Tabla 5.** Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos analizados en la región *IFIH1* en enfermos de Crohn, colitis ulcerosa y en controles, estratificados por género.

		EC		CU		Controles	
		Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>IFIH1</b>							
	<b>rs2068330</b>						
	GG <sup>1</sup>	71 (39.0)	65 (38.7)	71 (49.0)	74 (33.9)	72 (36.4)	79 (42.3)
	GC	86 (47.3)	76 (45.2)	61 (42.0)	106 (48.6)	96 (48.5)	85 (45.5)
	CC	25 (13.7)	27 (16.1)	13 (9.0)	38 (17.4)	30 (15.1)	23 (12.3)
	G	228 (62.6)	206 (61.3)	203 (70.0)	254 (58.3)	240 (60.6)	243 (65.0)
	C	136 (37.4)	130 (38.7)	87 (30.0)	182 (41.7)	156 (39.4)	131 (35.0)
<b>rs1990760</b>	AA <sup>2</sup>	68 (41.2)	56 (35.7)	64 (45.7)	62 (30.0)	69 (34.9)	68 (36.4)
	AG	72 (43.6)	77 (49.0)	58 (41.4)	106 (51.2)	90 (45.5)	92 (49.2)
	GG	25 (15.2)	24 (15.3)	18 (12.9)	39 (18.8)	39 (19.7)	27 (14.4)
	A	208 (63.0)	189 (60.2)	186 (66.4)	230 (55.6)	228 (57.6)	228 (61.0)
	G	122 (37.0)	125 (39.8)	94 (33.6)	184 (44.4)	168 (42.4)	146 (39.0)
<b>rs2111485</b>	CC <sup>3</sup>	62 (37.4)	54 (35.3)	65 (44.8)	59 (28.4)	65 (34.6)	70 (38.5)
	CT	77 (46.4)	75 (49.0)	59 (40.7)	103 (49.5)	88 (46.8)	88 (48.4)
	TT	27 (16.3)	24 (15.7)	21 (14.5)	46 (22.1)	35 (18.6)	24 (13.2)
	C	201 (60.5)	183 (59.8)	189 (65.2)	221 (53.1)	218 (58.0)	228 (62.6)
	T	131 (39.5)	123 (40.2)	101 (34.8)	195 (46.9)	158 (42.0)	136 (37.4)

<sup>1</sup> GG vs. GC+CC, mujeres CU vs. hombres CU: p=0.004.

mujeres CU vs. controles: p=0.02; OR (95% IC)= 1.53 (1.04-2.25).

<sup>2</sup> AA vs. AG+GG, mujeres CU vs. hombres CU: p=0.003.

mujeres CU vs. controles: p=0.02; OR (95% IC)= 1.54 (1.04-2.29).

<sup>3</sup> CC vs. CT+TT, mujeres CU vs. hombres CU: p=0.001.

mujeres CU vs. controles: p=0.06; OR (95% IC)= 1.43 (0.97-2.11).

En cuanto a los polimorfismos analizados en el gen **CLEC16A**, como hemos mencionado anteriormente, no observamos asociación con la colitis ulcerosa ni con la enfermedad de Crohn. Sin embargo, como se puede observar en la tabla 6, cuando dividimos a los pacientes de Crohn en dos grupos, los que presentan algún polimorfismo de riesgo en el gen *NOD2/CARD15* (NOD2+) y los que no (NOD2-), la frecuencia de portadores del alelo mayoritario rs2903692\_G era significativamente diferente entre ambos grupos. En el grupo control no existían diferencias entre los individuos NOD2- y los NOD2+, por lo que para tener mayor potencia los consideramos conjuntamente. De manera que si comparamos cada uno de estos grupos con los controles, los enfermos NOD2+ no diferían significativamente de estos; sin embargo, en los enfermos de Crohn NOD2-, la frecuencia de portadores estaba significativamente aumentada con respecto al grupo control.

**Tabla 6.** Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos analizados en el gen *CLEC16A* en enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y controles estratificados según la presencia/ausencia de mutaciones en el gen *NOD2/CARD15*.

		EC NOD2 <sup>-</sup>	EC NOD2 <sup>+</sup>	Controles
		n (%)	n (%)	n (%)
<b>CLEC16A</b> <b>rs2903692 *</b>	GG	92 (41.8)	39 (32.2)	187 (35.2)
	GA	105 (47.7)	56 (46.3)	247 (46.4)
	AA	23 (10.5)	26 (21.5)	98 (18.4)
	G	289 (65.7)	134 (55.4)	621 (58.4)
	A	151 (34.3)	108 (44.6)	443 (41.6)
<b>rs6498169</b>	AA	92 (42.0)	61 (50.8)	258 (47.1)
	AG	97 (44.3)	47 (39.2)	227 (41.4)
	GG	30 (13.7)	12 (10.0)	63 (11.5)
	A	281 (64.2)	169 (70.4)	743 (67.8)
	G	157 (35.8)	71 (29.6)	353 (32.2)

\* GG+GA vs. AA, EC NOD2<sup>-</sup> vs. EC NOD2<sup>+</sup>: p=0.005.

EC NOD2<sup>-</sup> vs. controles: p=0.007; OR (95% IC) = 1.93 (1.16-3.24).

En este trabajo hemos analizado por primera vez la implicación de los genes *IFIH1* y *CLEC16A* en la enfermedad inflamatoria intestinal. Ambos se habían visto asociados previamente a otras patologías autoinmunes, lo que hace interesante su estudio en la EII dado que hipotetizamos que muchas enfermedades de carácter autoinmune comparten factores de

susceptibilidad.

En un estudio de barrido genómico llevado a cabo en diabetes tipo 1 (87), se detectó una señal de asociación en la región 2q24, correspondiente a un SNP, rs1990760, localizado en el exón 15 del gen *IFIH1* que da lugar al cambio Ala946Thr. El estudio de esta región cromosómica permitió identificar varios polimorfismos asociados a esta patología. Sin embargo, el desequilibrio de ligamiento existente entre estos marcadores no permitió determinar cuál de ellos era el responsable del efecto observado. Se propuso como candidato más plausible el mencionado, ya que es el único que da lugar a un cambio aminoacídico.

En este trabajo llevamos a cabo el estudio de tres polimorfismos fuertemente asociados a DT1 en el estudio inicial, el SNP candidato (rs1990760) y otros dos flanqueando la zona asociada (rs2068330 y rs2111485). A la vista de nuestros datos, estos SNPs no parecen estar asociados a la colitis ulcerosa ni a la enfermedad de Crohn si se consideran globalmente pero, en los tres casos, el genotipo mayoritario parece conferir susceptibilidad específicamente a las mujeres con colitis ulcerosa.

En la literatura existen numerosos casos de genes asociados a distintas enfermedades autoinmunes en las que el efecto observado es específico de género (160, 161). Esto es de esperar teniendo en cuenta la influencia que ejercen las hormonas sexuales en distintos aspectos de la respuesta inmune. Así, muchos tipos de células inmunes como linfocitos T y B, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos y células NK expresan receptores de estrógenos. Se ha descrito que los estrógenos, como el 17 $\beta$ -estradiol, ejercen un efecto bifásico en la polarización de las células Th: bajos niveles promueven la diferenciación hacia Th1, mientras que niveles altos lo hacen hacia Th2. Además, los estrógenos aumentan el número de células Treg, promueven la diferenciación de células dendríticas y su producción de IL-12 y favorecen la expansión de células dendríticas productoras de IFN- $\gamma$  a partir de CD maduras del bazo, entre otras acciones (162). Por otro lado, los estrógenos parecen modular la expresión de otros receptores de la inmunidad innata como los TLRs (163).

En el mismo bloque de desequilibrio de ligamiento del gen *IFIH1* se localizan otros tres genes, *FAP* ("fibroblast activation protein"), *GCA* ("granulocyte activation protein") y *KCNH7* ("potassium voltage-gated channel, subfamily H, member 7"). El primero de ellos codifica una proteína que parece estar implicada en el crecimiento de los fibroblastos o en las interacciones entre el mesénquima y el epitelio durante el desarrollo, reparación de tejido y carcinogénesis epitelial. El producto del gen *GCA* es una proteína de unión a calcio abundante en neutrófilos y macrófagos que

participa en la fusión de membranas y gránulos y en la desgranulación. Finalmente, la proteína codificada por *KCNH7* es un canal de potasio regulado por voltaje que participa en numerosas funciones tales como liberación de neurotransmisores, transporte de electrolitos a través del epitelio o secreción de insulina, entre otras. Aunque por el momento no puede descartarse que la señal detectada se deba a alguno de estos genes, *IFIH1* es el principal candidato para ejercer un papel en la patología autoinmune por la función que desempeña. Además, se ha descrito que varios SNPs localizados en este gen, entre ellos este polimorfismo no sinónimo, influyen en el nivel de expresión génica en células mononucleares periféricas (164).

Por otro lado, estudios recientes han descrito un papel de este gen en otras enfermedades con componente inmune como el déficit de IgA (165) y la enfermedad de Graves (166), lo que apoya su posible papel en la colitis ulcerosa.

A la vista de nuestros datos, el gen *IFIH1* parece ser un factor de susceptibilidad específico para las mujeres con colitis ulcerosa. Sería necesario un estudio de replicación para tratar de corroborar este hallazgo, sin embargo, no se ha publicado en la literatura ningún estudio de asociación que analice el papel de este gen en la EII. Además, los estudios de barrido genómico realizados en colitis ulcerosa no han descrito una señal de asociación en la región que contiene al gen *IFIH1*. Sin embargo, esta asociación podría haber pasado desapercibida dado que ninguno de tales estudios ha llevado a cabo un análisis estratificado en función del género.

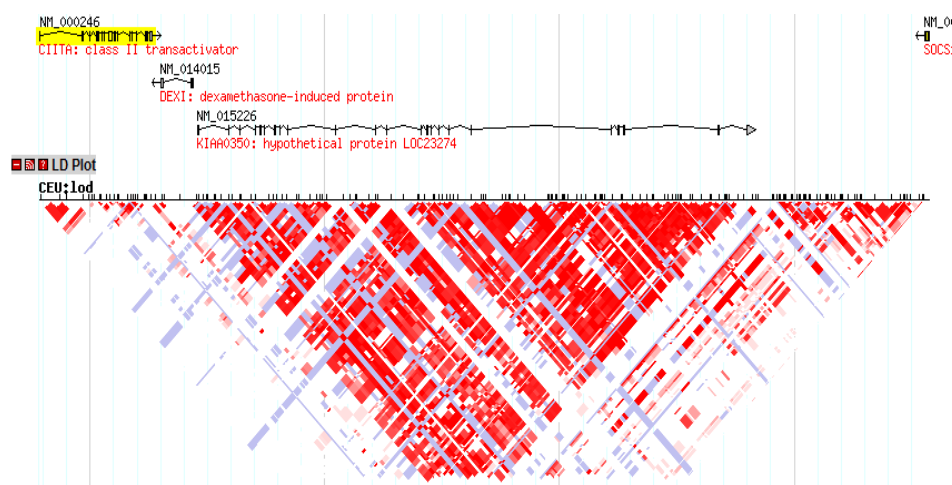
Un estudio de barrido genómico llevado a cabo en enfermos de DT1 encontró una asociación con varios polimorfismos situados en la región 16p13, concretamente en el gen ***CLEC16A*** (90). Además uno de estos SNPs, el rs2903692, parecía estar implicado funcionalmente en la patología ya que una línea celular homocigota para el alelo minoritario de dicho polimorfismo presentaba una expresión aumentada del gen *CLEC16A*. Simultáneamente, otro estudio de este tipo, realizado en enfermos de esclerosis múltiple, observó que el SNP rs6498169, localizado en este gen, confería susceptibilidad a la enfermedad (91).

El análisis de estos dos polimorfismos en nuestra muestra de enfermos de EII y controles nos proporcionó evidencias de una asociación del SNP funcional con aquellos enfermos de Crohn que no presentan ninguna mutación en el gen *CARD15*. Al igual que en el estudio realizado en DT1, el alelo mayoritario del SNP rs2903692 confiere susceptibilidad a este subgrupo de enfermos de Crohn.

Como ya se ha comentado, el gen *CARD15* es un sensor intracelular de peptidoglicano

que lleva a cabo una función similar a la que presumiblemente desempeña la proteína codificada por el gen *CLEC16A*. Existen datos en la literatura que describen interacciones epistáticas entre el gen *CARD15* y otros receptores del sistema inmune innato (167, 168). Por otro lado, otro miembro de la superfamilia de lectinas tipo C, el gen *DC-SIGN* (“dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin”), se ha visto implicado en la susceptibilidad a padecer colitis ulcerosa (169), apoyando la importancia que tiene el proceso de reconocimiento de patógenos en la EII.

Nuestros resultados describen por primera vez la implicación del gen *CLEC16A* en la enfermedad de Crohn. Dentro de la región 16p13 también podemos encontrar otros genes con un importante papel en el sistema inmune como *SOCS1* (“suppressor of cytokine signaling 1”) y *CIITA* (“class II, major histocompatibility complex, transactivator”). El gen *SOCS1* codifica una proteína que actúa como un regulador negativo de la señalización de citoquinas y la proteína codificada por *CIITA* actúa como el principal transactivador de la transcripción de los genes del complejo HLA de clase II. Sin embargo, como se puede observar en la figura 16, ambos genes se encuentran en bloques de desequilibrio distintos al de *CLEC16A*, por tanto, es más probable que la señal detectada se deba a este último. Además, se ha estudiado el papel del gen *CIITA* en la EII y no se han encontrado evidencias de asociación (170). Los datos disponibles hasta el momento parecen indicar que el polimorfismo rs2903692 podría ser la variante etiológica ya que parece influir en la expresión del gen, sin embargo no han aparecido nuevos estudios que repliquen este hallazgo.



**Figura 16.** Desequilibrio de ligamiento en la región 16p13 (figura obtenida de [www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)). Los colores indican el valor del coeficiente  $D'$ , desde  $D'=1$  (rojo) hasta  $D'=0$  (blanco).

## 4.2 Genes implicados en autofagia: *IRGM* y *ATG16L1*

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos analizados en ambos "loci", uno en *ATG16L1* y dos en *IRGM*, se muestran en la tabla 7.

Como puede observarse, en el caso de los marcadores localizados en la región del gen *IRGM*, el polimorfismo rs4958847 no presentaba asociación con la enfermedad de Crohn ni con la colitis ulcerosa. Sin embargo, la frecuencia de portadores del alelo minoritario del polimorfismo rs10065172 se encontraba significativamente aumentada en enfermos de Crohn con respecto a controles sanos, pero no en enfermos de colitis.

Para el polimorfismo analizado en el gen *ATG16L1*, el genotipo rs2241880\_GG parece proporcionar susceptibilidad a la enfermedad de Crohn pero no a la colitis ulcerosa, de hecho observamos una diferencia estadísticamente significativa entre ambas enfermedades.

**Tabla 7.** Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos analizados en los genes *IRGM* y *ATG16L1* en enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y controles.

		EC			CU			Controles		
		n (%)			n (%)			n (%)		
<b><i>IRGM</i></b>	<b>rs10065172</b>	Genotipos				Alelos				
		CC	276 (68.5)			C	662 (82.1)			1615 (85.4)
		CT	110 (27.3)			T	144 (17.9)			275 (14.6)
		TT <sup>1</sup>	17 (4.2)							
<b>rs4958847</b>		GG	243 (62.0)			G	615 (78.4)			1516 (80.6)
		GA	129 (32.9)			A	169 (21.6)			366 (19.4)
		AA	20 (5.1)							
<b><i>ATG16L1</i></b>	<b>rs2241880</b>	GG <sup>2</sup>	125 (36.3)			G	406 (59.0)			789 (53.0)
		GA	156 (45.4)			A	282 (41.0)			701 (47.0)
		AA	63 (18.3)							

<sup>1</sup> TT vs. CT+CC, EC vs. controles: p=0.03 ; OR (95% IC)= 2.04 (1.01-4.11).

<sup>2</sup> GG vs. GA+AA, EC vs. controles: p=0.008; OR (95% IC)=1.28 (1.06-1.54).  
EC vs. CU: p= 0.003.

En este caso cuando estratificamos los enfermos de Crohn y de colitis atendiendo a características clínicas no observamos diferencias estadísticamente significativas. No obstante,



al dividir a los enfermos de Crohn según presenten la forma ileal (ileales más ileocolónicos) o colónica (colónicos puros) de la enfermedad, observamos un valor próximo a la significación, como se refleja en la tabla 8. Además, al comparar cada uno de estos grupos con los controles, la frecuencia del genotipo mayoritario sólo estaba significativamente aumentada en los enfermos de Crohn con la forma ileal de la enfermedad.

**Tabla 8.** Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo analizado en el gen *ATG16L1* en enfermos de Crohn ileales y colónicos y en controles.

		EC ileal	EC colónica	Controles
		n (%)	n (%)	n (%)
<b>ATG16L1 rs2241880</b>	GG	93 (37.8) *	12 (24.0)	221 (29.7)
	GA	107 (43.5)	28 (56.0)	347 (46.6)
	AA	46 (18.7)	10 (20.0)	177 (23.8)
	G	293 (59.6)	52 (52.0)	789 (53.0)
	A	199 (40.4)	48 (48.0)	701 (47.0)

\* GG vs. GA+AA, EC ileal vs. EC colónica:  $p=0.06$ .

EC ileal vs. controles:  $p=0.02$ ; OR (95% IC)=1.44 (1.05-1.97).

Al combinar los estudios de asociación del gen *ATG16L1* publicados y nuestros propios resultados mediante un test Mantel-Haenszel, encontramos que el genotipo rs2241880\_GG confiere susceptibilidad a la enfermedad de Crohn [ $p<10^{-4}$ ; OR (95% IC)=1.52 (1.42–1.62)], pero no a la colitis ulcerosa [ $p=0.69$ ; OR (95% IC)=1.01 (0.97–1.06)]. Tras la estratificación por formas clínicas, observamos que existía una diferencia significativa entre los enfermos de Crohn ileales y los controles [ $p<10^{-4}$ ; OR (95% IC)=1.41 (1.33–1.49)], sin embargo en las comparaciones que involucraban la forma colónica de la enfermedad había mucha heterogeneidad entre los estudios ( $p<0.003$ ,  $I^2>60\%$ ). Al descartar los estudios más heterogéneos, observamos una diferencia en el límite de la significación entre ileales y colónicos y una diferencia significativa entre enfermos de Crohn colónicos y controles [ $p=0.03$ ; OR (95% IC)=1.19 (1.06–1.33)].

Uno de los resultados más sorprendentes obtenidos mediante estudios de barrido genómico ha sido la asociación de la EII con genes relacionados con en el proceso de autofagia. En nuestro trabajo hemos analizado dos genes implicados en esta vía que han

mostrado una asociación con la EI en estudios anteriores, *ATG16L1* e *IRGM*.

La asociación del gen ***ATG16L1*** con la EC, concretamente del polimorfismo rs2241880, se describió en un estudio de barrido genómico (54) y posteriormente ha sido replicada en numerosas ocasiones (15, 50, 57, 60, 103-113). Se trata de un SNP no sinónimo que da lugar al cambio Ala300Thr, con el alelo mayoritario confiriendo susceptibilidad a padecer la enfermedad de Crohn. Sin embargo, la asociación genotipo-fenotipo no está clara y se han encontrado resultados contradictorios. En algunos casos se ha observado asociación con la forma ileal de la EC (104, 171) mientras que en otros se ha descrito una asociación específica con la forma colónica (106). Así mismo, no está claro si se trata de un gen de susceptibilidad únicamente para la EC o es compartido por la CU (171).

Mediante el análisis de este SNP no sinónimo en nuestra muestra de EC, CU y controles corroboramos la asociación del gen *ATG16L1* con la enfermedad de Crohn, con un efecto similar al descrito en los estudios anteriores, pero no observamos asociación con la colitis ulcerosa. Cuando estratificamos a los enfermos de Crohn en base a las formas clínicas de la enfermedad, encontramos que, a diferencia de los enfermos colónicos, el grupo de enfermos ileales es significativamente diferente del grupo control. Sin embargo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los enfermos de Crohn ileales y colónicos, aunque no podemos sacar conclusiones definitivas de este resultado debido a la baja potencia estadística de este análisis.

Decidimos llevar a cabo un meta-análisis con los estudios publicados anteriormente para aumentar la potencia estadística (15, 50, 54, 57, 60, 103-113). Como esperábamos, al combinar los resultados de los diferentes estudios encontramos que el polimorfismo rs2241880 se asocia a la enfermedad de Crohn, pero no a la colitis ulcerosa. Cuando realizamos el análisis genotipo-fenotipo encontramos una diferencia significativa entre los enfermos de Crohn ileales y los controles. Sin embargo, al comparar la forma ileal de la enfermedad de Crohn con la colónica así como el grupo de enfermos colónicos con los controles, observamos una gran heterogeneidad entre los estudios. Esta heterogeneidad podría deberse a una clasificación clínica diferente de los enfermos de Crohn en los diferentes estudios incluidos en el meta-análisis.

Por tanto, a la vista de estos datos, *ATG16L1* parece ser un gen de susceptibilidad únicamente para los enfermos de Crohn, pero la heterogeneidad observada en las comparaciones que implican a la forma colónica de esta patología, no nos permite determinar

si se asocia de forma específica a algún subgrupo clínico.

Una vez establecida la implicación de este gen en la patología, se han realizado numerosos estudios funcionales para determinar el papel que desempeña en la enfermedad de Crohn. Un estudio utilizando ARN de interferencia dirigido frente a ATG16L1 demostró que la proteína es requerida para el mecanismo de autofagia (57). Además, mediante estudios en ratones se ha observado que los macrófagos deficientes en Atg16L1 producen grandes cantidades de las citoquinas inflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18 cuando son estimulados con LPS (172). Por otro lado, se han llevado a cabo estudios con el fin de determinar si el polimorfismo asociado a la EC, está implicado funcionalmente en la patología. Así, mediante experimentos de “knock-down” y reconstitución en líneas celulares humanas se ha visto que la presencia del alelo de riesgo del polimorfismo Ala300Thr afecta a la captura e internalización de *Salmonella* dentro de los autofagosomas (173). Además, los ratones que expresan niveles reducidos de la proteína, así como los pacientes de Crohn homocigotos para el alelo de riesgo del polimorfismo Ala300Thr, presentan anomalías en las células de Paneth (174). Recientemente, tres estudios han descrito que existe una interacción funcional entre las proteínas NOD2 y ATG16L1 durante la respuesta antibacteriana intracelular (175-177). Tales estudios proponen distintos mecanismos de interacción pero, en los tres casos, los alelos de susceptibilidad a la EC de los genes *NOD2* y *ATG16L1* suponen una interrupción de este mecanismo.

Todos estos estudios funcionales, el hecho de que este SNP de lugar a un cambio aminoacídico y que la asociación haya sido observada en diferentes poblaciones caucásicas, sugiere que esta variante es la responsable de la predisposición conferida a la enfermedad de Crohn. Sin embargo, en un estudio llevado a cabo en población japonesa no se replicó dicha asociación (178). Esta diferencia étnica podría indicar la existencia de una interacción gen-gen, una interacción gen-ambiente, o que este SNP es simplemente un marcador genético en fuerte desequilibrio de ligamiento con la variante causal solo en población caucásica.

En cuanto al gen *IRGM*, su asociación con la enfermedad de Crohn se describió por primera vez en un estudio de barrido genómico en el que encontraron dos SNPs, rs13361189 y rs4958847, asociados con la EC (50). Posteriormente, un estudio (116) cuyo objetivo era replicar las asociaciones observadas en el primero, corroboró dicha asociación y, además, dado que ninguno de estos polimorfismos daba lugar a un cambio aminoacídico, resecuenciaron el gen *IRGM* para tratar de encontrar nuevas variantes. Identificaron una variante sinónima, rs10065172, que también mostraba asociación con la EC, ya que era

equivalente al rs13361189.

Decidimos estudiar en nuestra muestra de enfermos de Crohn y de colitis ulcerosa dos de los SNPs asociados a la EC, rs4958847 y rs10065172, y encontramos que el segundo se asocia a la EC, pero no a la colitis ulcerosa ni con ninguna forma clínica específica.

Con posterioridad a nuestro trabajo, McCarroll y colaboradores identificaron una delección a 20 Kb del gen *IRGM* y en perfecto desequilibrio de ligamiento con el SNP rs13361189 y por tanto con el polimorfismo analizado por nosotros, rs10065172 (179). Esta delección parece influir en la expresión de *IRGM* en células transformadas, por lo que se consideró la verdadera responsable de la asociación observada. Sin embargo, recientemente, ha aparecido otro estudio (180) que describe una asociación con la enfermedad de Crohn del microsatélite –308 (GTTT), localizado en la región 5'UTR del gen *IRGM*, a pesar de que la nomenclatura utilizada en este estudio hace pensar que se localiza en la región promotora. El alelo –308 (GTTT)<sub>5</sub> parece conferir susceptibilidad a la enfermedad de Crohn de manera independiente a la delección anteriormente descrita y además podría tener un papel funcional, ya que da lugar a un sitio de “splicing” alternativo. Por otro lado, ninguno de los polimorfismos descritos hasta la fecha se encuentra asociado a la EC en población japonesa, ni influyen en la expresión del gen *IRGM* en esta población (180, 181). Por lo tanto, como ocurría en el caso del gen *ATG16L1*, es posible que ninguna de las variantes asociadas a la patología sean en realidad las que confieren susceptibilidad a la EC o que la susceptibilidad conferida por la variante esté sujeta a algún tipo de interacción ausente en la población asiática.

### 4.3 Genes que codifican citoquinas y receptores de citoquinas: *MST1*, *IL2*, *IL2RA*, *IL2RB*, *IL23R* e *IL12B*.

Al realizar el estudio caso-control para los polimorfismos analizados en estos “loci”, observamos que todos ellos mostraban una asociación con la enfermedad inflamatoria intestinal, algunos con la enfermedad de Crohn, otros con la colitis ulcerosa, y en algunos casos con ambas patologías.

En la región 3p21, donde se localiza el gen *MST1*, estudiamos tres polimorfismos cuyas frecuencias genotípicas y alélicas aparecen recogidas en la tabla 9. Cuando realizamos el estudio caso-control encontramos que los alelos minoritarios rs9858542\_A y rs2131109\_T y el mayoritario rs2271961\_T conferían susceptibilidad a la enfermedad de Crohn, mientras que los enfermos de colitis no diferían de los controles. Además, observamos que en los tres marcadores estas frecuencias diferían significativamente entre los enfermos de Crohn y los enfermos de colitis ulcerosa.

**Tabla 9.** Frecuencias genotípicas y alélicas de los marcadores analizados en la región 3p21 en enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y controles.

		EC		CU		Controles		EC		CU		Controles	
MST1	Genotipos	n (%)	n (%)	n (%)	Alelos	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
	rs9858542	GG	140 (38.5)	182 (46.4)	380 (47.6)	G A <sup>1</sup>	455 (62.5)	538 (68.6)	1106 (69.2)				
		GA	175 (48.1)	174 (44.4)	346 (43.3)		273 (37.5)	246 (31.4)	492 (30.2)				
		AA	49 (13.4)	36 (9.2)	73 (9.1)								
	rs2131109	CC	69 (18.7)	110 (27.3)	210 (26.6)	C T <sup>2</sup>	321 (43.4)	414 (51.4)	808 (51.1)				
		CT	183 (49.5)	194 (48.1)	388 (49.1)		419 (56.6)	392 (48.6)	772 (48.9)				
		TT	118 (31.9)	99 (24.6)	192 (24.3)								
	rs2271961	TT	122 (32.5)	106 (25.5)	189 (24.8)	T <sup>3</sup> C	428 (57.1)	433 (52.2)	778 (51.1)				
		TC	184 (49.1)	221 (53.3)	400 (52.5)		322 (42.9)	397 (47.8)	746 (48.9)				
		CC	69 (18.4)	88 (21.2)	173 (22.7)								

<sup>1</sup> A vs. G, EC vs. controles: p=0.001; OR (95% IC) = 1.35 (1.12-1.63).  
EC vs. CU: p=0.01.

<sup>2</sup> T vs. C, EC vs. controles: p=0.0005; OR (95% IC)= 1.37 (1.14-1.63).  
EC vs. CU: p=0.002.

<sup>3</sup> T vs. C, EC vs. controles: p=0.007; OR (95% IC)= 1.27 (1.06-1.53).  
EC vs. CU: p=0.002.

Al realizar el análisis genotipo-fenotipo, observamos que, como se muestra en la tabla 10, para los polimorfismos rs9858542 y rs2131109 existía una diferencia estadísticamente significativa entre los enfermos de Crohn ileales y los colónicos. Al compararlos con los controles, la frecuencia de portadores de los alelos rs9858542\_A y rs2131109\_T se encontraba significativamente incrementada sólo en los enfermos de Crohn ileales.

**Tabla 10.** Frecuencias genotípicas y alélicas de los marcadores analizados en la región del gen *MST1* en enfermos de Crohn ileales y colónicos y en controles.

		EC ileal	EC colónica	Controles
		n (%)	n (%)	n (%)
<b>MST1</b>				
<b>rs9858542</b> <sup>1</sup>	GG	80 (34.3)	23 (50.0)	380 (47.6)
	GA	122 (52.4)	16 (34.7)	346 (43.3)
	AA	31 (13.3)	7 (15.2)	73 (9.1)
<b>rs2131109</b> <sup>2</sup>	G	282 (60.5)	62 (67.4)	1106 (69.2)
	A	184 (39.5)	30 (32.6)	492 (30.2)
	CC	35 (14.9)	17 (34.7)	210 (26.6)
	CT	122 (51.9)	17 (34.7)	388 (49.1)
	TT	78 (33.2)	15 (30.6)	192 (24.3)
	C	192 (40.9)	51 (52.0)	808 (51.1)
<b>rs2271961</b>	T	278 (59.1)	47 (48.0)	772 (48.9)
	TT	78 (32.5)	15 (31.9)	189 (24.8)
	TC	121 (50.4)	23 (48.9)	400 (52.5)
	CC	41 (17.1)	9 (19.2)	173 (22.7)
	T	277 (57.7)	53 (56.4)	778 (51.1)
	C	203 (42.3)	41 (43.6)	746 (48.9)

<sup>1</sup> GA+AA vs. GG, EC ileal vs. EC colónica: p=0.04.

EC ileal vs. controles: p=0.0004; OR (95% IC) = 1.73 (1.27-2.38).

<sup>2</sup> CT+TT vs. CC, EC ileal vs. EC colónica: p=0.001.

EC ileal vs. controles: p=0.0002; OR (95% IC) = 2.07 (1.38-3.12).

Finalmente, como se refleja en la tabla 11, al comparar las frecuencias haplotípicas entre los enfermos de Crohn ileales y los controles encontramos un haplotipo de susceptibilidad

(ATT) marcado por el alelo rs9858542\_A y otro de protección (GCC) que no estaba marcado por ninguno de los polimorfismos analizados.

**Tabla 11.** Frecuencia de los haplotipos formados por los polimorfismos analizados en la región *MST1* en enfermos de Crohn ileales y en controles.

	EC ileal	Controles
(rs9858542/rs2131109/rs2271961)	n (%)	n (%)
ATT <sup>1</sup>	183 (39.4)	491 (30.6)
GCC <sup>2</sup>	104 (22.3)	493 (30.7)
GCT	85 (18.3)	327 (20.4)
GTC	93 (19.9)	288 (17.9)

<sup>1</sup> EC ileal vs. controles: p=0.0004; OR (95% IC)= 1.47 (1.18-1.83).

<sup>2</sup> EC ileal vs. controles: p=0.0004; OR (95% IC)= 0.65 (0.50-0.83).

La tabla 12 muestra las frecuencias alélicas y genotípicas de los marcadores analizados en los “loci” *IL2*, *IL2RA* e *IL2RB*.

Dos de los tres polimorfismos analizados en la región que comprende el gen *IL2* mostraban asociación con la enfermedad inflamatoria intestinal. Concretamente, el alelo minoritario del marcador rs11938795 se encontraba significativamente disminuido en Crohn con respecto a controles, mientras que el alelo minoritario del polimorfismo rs6822844 confería protección tanto a Crohn como a colitis.

En la región *IL2RA* analizamos tres marcadores. Únicamente la frecuencia del alelo minoritario del polimorfismo rs2104286 aparecía significativamente disminuida en enfermos de colitis ulcerosa con respecto a controles.

En cuanto a los SNPs estudiados en el gen *IL2RB*, ninguno de ellos mostraba asociación con la enfermedad de Crohn ni con la colitis ulcerosa.

**Tabla 12.** Frecuencias genotípicas y alélicas de los marcadores analizados en las regiones *IL2*, *IL2RA* e *IL2RB* en enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y controles.

		EC	CU	Controles		EC	CU	Controles	
IL2	Genotipos	n (%)	n (%)	n (%)	Alelos	n (%)	n (%)	n (%)	
	rs11938795	TT	217 (61.0)	195 (54.5)	293 (53.7)	T C <sup>1</sup>	557 (78.2)	531 (74.2)	792 (72.5)
		TC	123 (34.6)	141 (39.4)	206 (37.7)		155 (21.8)	185 (25.8)	300 (27.5)
		CC	16 (4.5)	22 (6.2)	47 (8.6)				
rs17388568	GG	197 (55.5)	181 (48.9)	289 (53.5)	G A	522 (73.5)	523 (70.7)	792 (73.3)	
	GA	128 (36.1)	161 (43.5)	214 (39.6)		188 (26.5)	217 (29.3)	288 (26.7)	
	AA	30 (8.4)	28 (7.6)	37 (6.9)					
rs6822844	GG	288 (82.5)	290 (80.3)	405 (73.8)	G T <sup>2</sup>	636 (91.1)	647 (89.6)	946 (86.2)	
	GT	60 (17.2)	67 (18.6)	136 (24.8)		62 (8.9)	75 (10.4)	152 (13.8)	
	TT	1 (0.3)	4 (1.1)	8 (1.5)					
IL2RA	rs2104286	TT	222 (62.5)	256 (70.7)	338 (61.8)	T C <sup>3</sup>	561 (79.0)	604 (83.4)	860 (78.6)
		TC	117 (33.0)	92 (25.4)	184 (33.6)		149 (21.0)	120 (16.6)	234 (21.4)
		CC	16 (4.5)	14 (3.9)	25 (4.6)				
	rs41295061	AA	302 (87.8)	323 (89.5)	479 (87.6)	A C	645 (93.8)	684 (94.7)	1024 (93.6)
AC		41 (11.9)	38 (10.5)	66 (12.1)	43 (6.2)		38 (5.3)	70 (6.4)	
CC		1 (0.3)	0	2 (0.4)					
rs11594656	TT	153 (46.1)	149 (42.6)	251 (46.2)	T A	455 (68.5)	456 (65.1)	746 (68.7)	
	TA	149 (44.9)	158 (45.1)	244 (44.9)		209 (31.5)	244 (34.9)	340 (31.3)	
	AA	30 (9.0)	43 (12.3)	48 (8.8)					
IL2RB	rs743777	AA	158 (45.1)	154 (42.4)	242 (45.2)	A G	476 (68.0)	473 (65.2)	705 (65.8)
		AG	160 (45.7)	165 (45.5)	221 (41.2)		224 (32.0)	253 (34.8)	367 (34.2)
		GG	32 (9.1)	44 (12.1)	73 (13.6)				
	rs9622555	GG	182 (51.3)	180 (48.4)	268 (49.0)	G T	508 (71.6)	513 (69.0)	754 (68.9)
GT		144 (40.6)	153 (41.1)	218 (40.0)	202 (28.4)		231 (31.0)	340 (31.1)	
TT		29 (8.2)	39 (10.5)	61 (11.0)					

<sup>1</sup> C vs. T, EC vs. controles: p=0.006; OR (95% IC)= 0.73 (0.58-0.92).<sup>2</sup> T vs. G, EC vs. controles: p=0.002; OR (95% IC)= 0.61 (0.44-0.84).

CU vs. controles: p=0.03; OR (95% IC)= 0.72 (0.53-0.98).

<sup>3</sup> C vs. T, CU vs. controles: p=0.01; OR (95% IC)= 0.73 (0.57-0.94).



Posteriormente, en colaboración con el grupo del Dr. Javier Martín, llevamos a cabo un estudio de replicación de las asociaciones observadas en una muestra independiente consistente en 562 enfermos de Crohn, 430 pacientes con colitis ulcerosa y 1310 controles sanos procedentes de Granada y Cádiz. De acuerdo con los resultados encontrados, la frecuencia del alelo minoritario de los SNPs rs11938795 y rs6822844 estaba significativamente disminuida en pacientes de Crohn comparados con controles [ $p=0.022$ ; OR (95% IC)= 0.82 (0.70 – 0.98) y  $p=0.020$ ; OR (95% IC)= 0.76 (0.61 – 0.94), respectivamente], observándose una tendencia similar para colitis pero sin llegar a ser significativa. En esta muestra independiente no había indicios de asociación de los genes *IL2RA* e *IL2RB* con la EII.

Para aumentar la potencia de nuestro estudio decidimos unir las dos colecciones, previa comprobación de que ambas eran homogéneas. Como era de esperar corroboramos la asociación observada con la EC para los dos SNPs de la región *IL2* [ $p=0.0005$ ; OR (95% IC)= 0.79 (0.69 – 0.90), para el rs11938795 y  $p=0.0002$ ; OR (95% IC)= 0.70 (0.58 – 0.84), para el rs6822844]. Además, al aumentar la potencia estadística, encontramos que la frecuencia del alelo minoritario del polimorfismo rs6822844 se encuentra significativamente disminuida en enfermos de colitis comparados con controles [ $p=0.009$ ; OR (95% IC)= 0.76 (0.54 – 0.94)]. Sin embargo, los genes *IL2RA* e *IL2RB* no muestran asociación con la EII en el análisis combinado.

En la tabla 13 aparecen reflejadas las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos estudiados en los genes *IL23R* e *IL12B*.

Los dos marcadores analizados en el gen *IL23R* mostraban asociación con la enfermedad de Crohn. En ambos el alelo minoritario se encontraba significativamente disminuido en Crohn con respecto a controles.

En el caso de los polimorfismos estudiados en el gen *IL12B*, la frecuencia del alelo minoritario rs6887695\_C, se encontraba significativamente aumentada en los enfermos de colitis ulcerosa comparados con los controles.

**Tabla 13.** Frecuencias genotípicas y alélicas de los marcadores analizados en los genes *IL23R* e *IL12B* en enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y controles.

		EC	CU	Controles		EC	CU	Controles
	Genotipos	n (%)	n (%)	n (%)	Alelos	n (%)	n (%)	n (%)
<b><i>IL23R</i></b>	TT	145 (42.4)	149 (41.0)	192 (35.2)	T G <sup>1</sup>	451 (65.9) 233 (34.1)	458 (63.1) 268 (36.9)	644 (59.0) 448 (41.0)
	TG	161 (47.1)	160 (44.1)	260 (47.6)				
	GG	36 (10.5)	54 (14.9)	94 (17.2)				
<b><i>rs7517847</i></b>	GG	323 (93.9)	334 (92.0)	486 (88.8)	G A <sup>2</sup>	666 (96.8) 22 (3.2)	697 (96.0) 29 (4.0)	1032 (94.3) 62 (5.7)
	GA	20 (5.8)	29 (8.0)	60 (11.0)				
	AA	1 (0.3)	0	1 (0.2)				
<b><i>IL12B</i></b>	TT	204 (61.4)	204 (57.3)	314 (58.1)	T G	520 (78.3) 144 (21.7)	534 (75.0) 178 (25.0)	825 (76.4) 255 (23.6)
	TG	112 (33.7)	126 (35.4)	197 (36.5)				
	GG	16 (4.8)	26 (7.3)	29 (5.4)				
<b><i>rs3212227</i></b>	GG	137 (40.4)	134 (37.3)	238 (44.3)	G C <sup>3</sup>	433 (63.9) 245 (36.1)	439 (61.1) 279 (38.9)	723 (67.3) 351 (32.7)
	GC	159 (46.9)	171 (47.6)	247 (46.0)				
	CC	43 (12.7)	54 (15.0)	52 (9.7)				
<b><i>rs6887695</i></b>								

<sup>1</sup> G vs. T, EC vs. controles: p=0.003; OR (95% IC)= 0.74 (0.61-0.91).

<sup>2</sup> A vs. G, EC vs. controles: p=0.02; OR (95% IC)= 0.55 (0.32-0.92).

<sup>3</sup> C vs. G, CU vs. controles: p=0.007; OR (95% IC)= 1.31 (1.07-1.60).

Finalmente, analizamos la posible interacción epistática entre estos dos genes observándose que la distribución genotípica de los distintos SNPs analizados en el gen *IL23R* no variaba dependiendo del genotipo presente en el polimorfismo rs6887695 del gen *IL12B*.

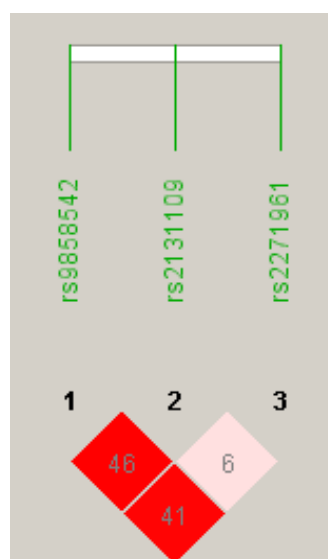
Algunos de los genes de citoquinas o de sus receptores incluidos en este estudio, como *MST1*, *IL23R* e *IL12B*, se habían visto asociados a la enfermedad inflamatoria intestinal, siendo nuestro principal objetivo replicar dicha asociación en una población independiente, lo cual resulta fundamental en este tipo de estudios. En otros casos analizamos por primera vez la influencia de ciertos genes, como *IL2*, *IL2RA* e *IL2RB*, en la susceptibilidad a padecer la EII analizando variantes previamente asociadas a otras patologías autoinmunes.

La región 3p21, que contiene al gen *MST1*, es uno de los “locus” implicados en la EII en los estudios iniciales de ligamiento, correspondiendo a la región de ligamiento IBD9 (182).

Años más tarde, un estudio de asociación mediante barrido genómico ha corroborado este hallazgo encontrando una asociación entre el polimorfismo rs9858542, localizado en el gen *BSN* dentro de este “locus”, y la EC (50). Cuando nos propusimos estudiar el papel de la región 3p21 en nuestra muestra de enfermos y controles, incluimos en nuestro estudio este polimorfismo y el SNP rs2131109, localizado en un intrón de este mismo gen, y seleccionado por su moderado desequilibrio con el primero. Durante el tiempo que duró nuestro estudio, se describió una asociación de otro SNP, localizado en esta misma región pero en un intrón del gen *TRAIP* (“TRAF interacting protein”), con la EC (121). Nos pareció interesante analizar este SNP ya que según este estudio se trataba de una señal independiente a la descrita inicialmente, por lo que incluimos un SNP equivalente a este polimorfismo en nuestro trabajo (rs2271961).

Por tanto, finalmente analizamos tres polimorfismos en la región 3p21 y en los tres casos encontramos asociación con la enfermedad de Crohn, pero no con la colitis ulcerosa. De hecho, las distribuciones genotípicas diferían significativamente entre los enfermos de Crohn y los de colitis. Además, nuestros datos indican que esta asociación es específica de la forma ileal de la enfermedad de Crohn.

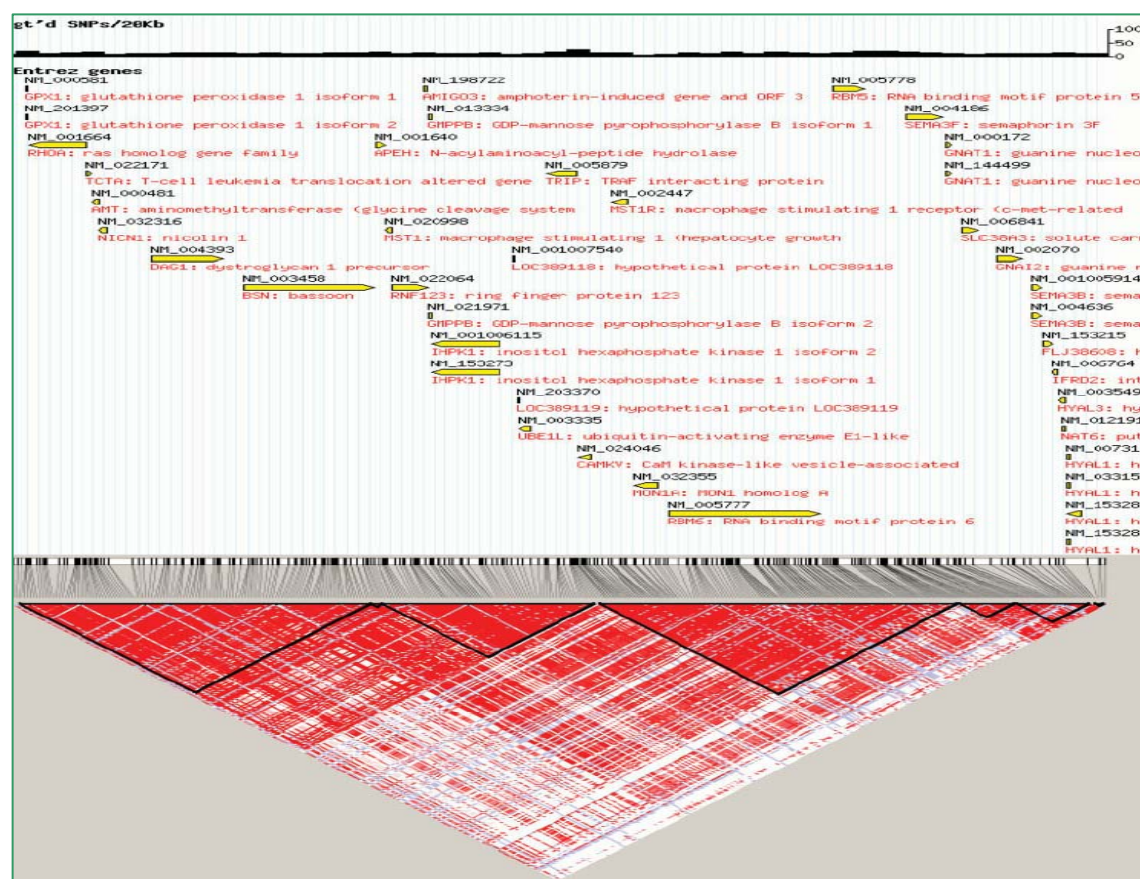
Decidimos construir haplotipos con el fin de abarcar más variabilidad de la región. El desequilibrio de ligamiento existente entre los SNPs analizados viene indicado en la figura 17. Al analizar las frecuencias haplotípicas observamos un haplotipo de susceptibilidad (ATT) marcado por el alelo rs9858542\_A, ya que este solo aparece formando parte de este haplotipo. Sin embargo, no parece que este SNP por sí solo pueda explicar el efecto ya que el haplotipo GTC que no presenta dicho alelo en la primera posición también se encuentra aumentado en los enfermos de Crohn ileales respecto a controles, aunque esta diferencia no llegue a ser significativa. Los haplotipos parecen indicar que el polimorfismo que mejor marca el efecto es el rs2131109, que además es el que tiene un efecto más fuerte por sí solo. La frecuencia de los dos haplotipos que contienen el alelo de susceptibilidad rs2131109\_T (ATT y GTC) aparece aumentada en enfermos con respecto a controles, mientras que la frecuencia de los dos haplotipos que contienen los alelos contrarios aparece disminuida (GCC y GCT). Una posible explicación al efecto observado mediante el estudio haplotípico podría ser la existencia de una variante etiológica, de manera que uno de sus alelos se encuentre en desequilibrio de ligamiento con los haplotipos ATT y GTC y el otro alelo con los haplotipos GCC y GCT, ya que además las frecuencias entre dichas parejas de haplotipos no son significativamente diferentes.



**Figura 17.** Desequilibrio de ligamiento entre los tres SNPs analizados en la región 3p21 (el color representa el valor de  $D'$  y la numeración indica el valor de  $r^2$ ).

Con posterioridad a nuestro estudio se ha descrito que la región 3p21 también se encuentra asociada a la colitis ulcerosa en distintas poblaciones de origen caucásico (60, 68, 122, 183). Sin embargo, nosotros no detectamos asociación con esta patología aún teniendo suficiente potencia estadística, ya que la “odds ratio” descrita para la CU es similar a la detectada por nosotros para los enfermos de Crohn. Es posible que esta asociación se limite a algún subgrupo que esté pobremente representado en nuestra muestra general de colitis y por esta razón el efecto quede diluido.

El gen *BSN* (basoon), donde se localiza el polimorfismo inicialmente asociado a la enfermedad inflamatoria intestinal, se expresa principalmente en neuronas y codifica una proteína involucrada en la organización del esqueleto presináptico por lo que no parece ser un buen candidato para estar implicado en la susceptibilidad a padecer EII. Sin embargo, esta primera señal se localiza en un bloque de disequilibrio de 600 kb, representado en la figura 18, que contiene numerosos genes con una función relevante en el sistema inmune y que, por tanto, podrían intervenir en la patogénesis de la enfermedad.



**Figura 18.** Desequilibrio de ligamiento en la región 3p21 (figura obtenida de [www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)). Los colores indican el valor del coeficiente D', desde D'=1 (rojo) hasta D'=0 (blanco).

Otro de los polimorfismos analizados en nuestro estudio y asociado previamente se localiza en el gen *TRAIP*. Este gen es un buen candidato ya que interacciona con las proteínas TRAFs ("TNF receptor-associated factor") que se unen al receptor del TNF y median sus señales de transducción. TRAIP se asocia al complejo TRAF/receptor e inhibe la activación de NF- $\kappa$ B mediada por TRAF2. Sin embargo, el estudio más profundo de la región que se ha realizado hasta la fecha ha concluido que la asociación observada se puede atribuir al gen *MST1* (122). En este estudio la asociación más fuerte se debe a un polimorfismo localizado en el gen *BSN* (prácticamente equivalente al rs9858542 analizado aquí). Al buscar SNPs con alto desequilibrio de ligamiento con este ( $r^2 > 0.9$ ), encontraron un polimorfismo no sinónimo localizado en el gen *MST1* que da lugar al cambio Arg689Cys. Actualmente, este polimorfismo es el principal candidato a ser responsable de la asociación observada en esta región ya que

da lugar a un cambio aminoacídico y está localizado en el gen *MST1* que, como hemos comentado en el capítulo introductorio, desempeña una función importante en el sistema inmune inhibiendo la respuesta inflamatoria. Además, este cambio Arg689Cys se localiza en una zona de la superficie de la cadena beta de la proteína que parece esencial para la unión al receptor *MST1R* (122). No obstante, aún no han aparecido estudios que impliquen funcionalmente a este SNP en la patología.

Otra de las citoquinas incluidas en este trabajo es IL-2, que como ya se ha comentado desempeña funciones muy diversas en el sistema inmune, teniendo especial interés en nuestro caso su papel en el mantenimiento de la homeostasis y función supresora de las células T reguladoras. Esta función la convierte en candidata para influir en la susceptibilidad a padecer enfermedades autoinmunes, de hecho se ha descrito su asociación a la enfermedad celíaca (131) y a la diabetes tipo 1 (184). Por esta razón decidimos estudiar varios polimorfismos en la región donde se localiza el gen que la codifica. Además, para profundizar en el papel de esta interleucina en la EII, estudiamos varios polimorfismos localizados en los genes *IL2RA* e *IL2RB* que codifican las subunidades alfa y beta del receptor de IL-2. De esta manera, llevamos a cabo el primer estudio del eje *IL2-IL2R* en la enfermedad inflamatoria intestinal.

En la región donde se localiza ***IL2***, seleccionamos tres polimorfismos para nuestro estudio, dos de ellos asociados a la enfermedad celíaca (131) (rs11938795 y rs6822844) y otro asociado a la DT1 (184) (rs17388568). Cuando comparamos las frecuencias alélicas de estos SNPs entre enfermos y controles observamos que los dos polimorfismos asociados a la enfermedad celíaca también se asocian a la EII y que, al igual que ocurre en celiaquía, el alelo minoritario de ambos marcadores muestra un efecto protector, frente a la EC en el caso del rs11938795 y frente a ambas formas de la EII en el caso del rs6822844. Por tanto, esta región parece estar implicada en la susceptibilidad a padecer enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

De forma simultánea a la realización de nuestro estudio, aparecieron dos trabajos (185, 186) en los que analizan varios polimorfismos en la región *IL2*, entre ellos el rs6822844. Por un lado, Festen y colaboradores (185) llevan a cabo un estudio en población holandesa y dos replicaciones posteriores, en población italiana y norteamericana. De acuerdo con nuestros resultados, este estudio describe una asociación de varios SNPs localizados en la región *IL2*, incluyendo el rs6822844, tanto con la EC como con la CU, pero con un efecto más fuerte en la última. Por otro lado, Glas y colaboradores (186) encuentran asociación de este mismo polimorfismo, con la colitis ulcerosa, pero no con la enfermedad de Crohn, en población

alemana. En ambos casos el efecto del marcador rs6822844 era similar al observado por nosotros, es decir, el alelo minoritario mostraba un efecto protector. Sin embargo, en ambos estudios, aunque no se llega a observar una asociación clara entre ninguno de los SNPs analizados y la EC, prácticamente todos ellos muestran una tendencia similar en ambas formas de la EII. Esto podría indicar que, como apuntan Festen y colaboradores, el efecto podría ser más fuerte en la colitis ulcerosa que en la enfermedad de Crohn lo que explicaría por qué el estudio alemán no es capaz de detectar la asociación con esta última. No obstante, nuestros datos no indican que el efecto del rs6822844 sea significativamente diferente en la EC y en la CU, ya que los intervalos de confianza de ambas “odds ratios” se solapan.

Recientemente, con los estudios publicados sobre esta región se ha llevado a cabo un meta-análisis (187) en el que el polimorfismo rs6822844 se ha asociado a numerosas enfermedades autoinmunes como lupus, síndrome de Sjogren, artritis reumatoide, diabetes tipo 1, celiaquía y EII, lo que apoya la idea de que las diferentes enfermedades autoinmunes probablemente comparten una serie de mecanismos moleculares.

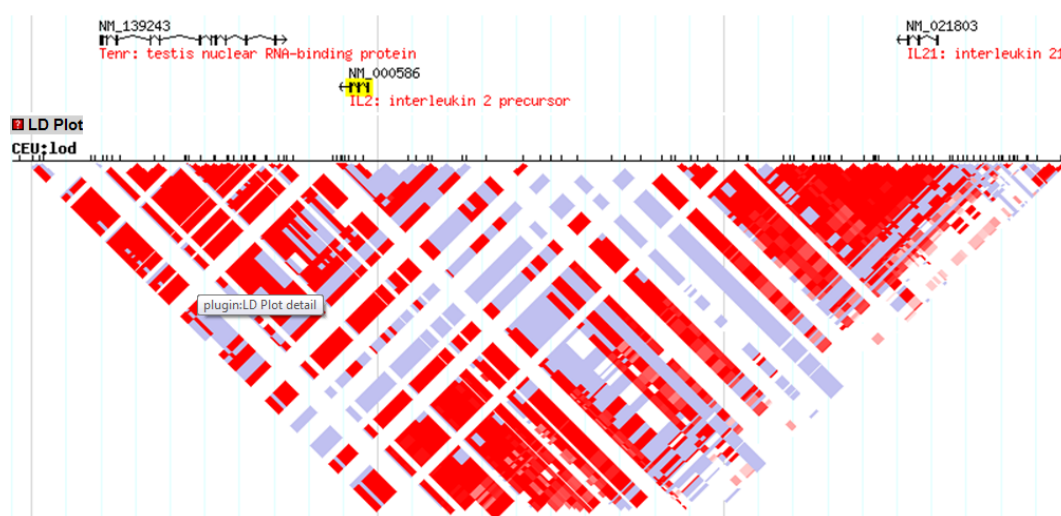
En todos los trabajos mencionados, incluido el nuestro, el SNP que presenta una asociación más fuerte con la EII es el rs6822844, pero el elevado desequilibrio de ligamiento existente en esta región hace difícil determinar cual de ellos es el polimorfismo etiológico. Este SNP no parece serlo ya que está localizado en una región intergénica, pero probablemente presente un elevado desequilibrio de ligamiento con la verdadera variante causal.

En cuanto al receptor, en el gen **IL2RA** analizamos tres polimorfismos previamente asociados a otras patologías autoinmunes. En un estudio realizado en diabetes tipo 1 (188) analizaron esta región en profundidad y encontraron dos grupos de polimorfismos independientes. Por lo cual decidimos estudiar un SNP de cada uno de estos grupos, ambos asociados con cambios en la concentración de la forma soluble de IL2RA en suero. Por otro lado, también incluimos otro SNP asociado a artritis reumatoide (50). Ninguno de estos marcadores se encontró asociado a la EII; sin embargo, un meta-análisis reciente (67), que engloba varios estudios de barrido genómico realizados en enfermos de Crohn, ha descrito la región 10p15 como una de las 39 regiones nuevamente asociadas a la EC y al gen **IL2RA** como candidato más factible. Probablemente, nuestro estudio carece de potencia estadística para detectar esta asociación, ya que el efecto del SNP asociado a la enfermedad en este meta-análisis es pequeño (OR= 1.11) y el  $r^2$  entre este y los SNPs analizados por nosotros es moderado ( $r^2$ = 0.66 en el mejor de los casos).

En cuanto al gen que codifica la otra subunidad del receptor, **IL2RB**, analizamos dos

polimorfismos, uno de ellos asociado a DT1 (50), que tampoco se asociaban según nuestros datos a la patología.

En la región donde se localiza *IL2* también se encuentra el gen *IL21* que desempeña un importante papel en el sistema inmune, ya que estimula la proliferación de las células T, B y NK y la producción de interferón gamma. El elevado desequilibrio de ligamiento existente en la región *IL2-IL21*, como se puede observar en la figura 19, no ha permitido determinar qué gen es el responsable del efecto observado en distintas enfermedades autoinmunes. Por lo tanto, con los datos disponibles hasta ahora ambas interleuquinas podrían estar implicadas en la EII. Se están comenzando a desarrollar tratamientos basados en IL-2 con buenos resultados en modelos experimentales de colitis ulcerosa (189), lo que apoyaría la idea de que *IL2* es el gen responsable del efecto observado.



**Figura 19.** Desequilibrio de ligamiento en la región 4q27 (figura obtenida de [www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)). Los colores indican el valor del coeficiente  $D'$ , desde  $D'=1$  (rojo) hasta  $D'=0$  (blanco).

Finalmente, analizamos la posible interacción epistática entre el gen *IL2* y los genes *IL2RA* e *IL2RB*, no encontrando evidencia de interacción entre ellos. Sin embargo, al interpretar el resultado negativo de este tipo de análisis hay que tener en cuenta que al tratarse de un estudio estratificado la potencia se puede ver comprometida.

A la vista de los datos parece que *IL2* es un gen de susceptibilidad tanto para Crohn como para colitis. En el caso de su receptor, aunque los SNPs incluidos en este estudio y previamente asociados al riesgo de padecer ciertas enfermedades autoinmunes no se asocian

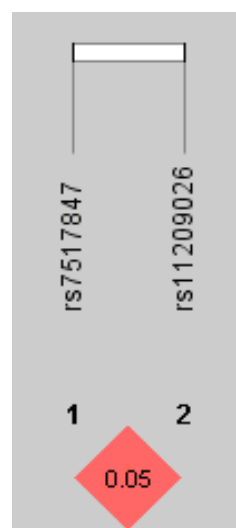


a la EII según nuestros datos, no podemos descartar la implicación de los genes *IL2RA* e *IL2RB* en la EII en nuestra población, principalmente teniendo en cuenta la reciente asociación del gen *IL2RA* con la EC.

Cuando nos propusimos estudiar el papel de *IL23R* en la enfermedad inflamatoria intestinal, la asociación de este gen con la patología únicamente se había observado en un estudio realizado en enfermos de Crohn ileales y de colitis ulcerosa (51). Con el objeto de replicar dicha asociación, analizamos en nuestra muestra de enfermos de EII dos SNPs (rs7517847 y rs11209026) asociados en el estudio original, y considerados señales independientes debido a su baja correlación ( $r^2=0.05$ ).

Al igual que en el estudio inicial, encontramos que el alelo minoritario de los dos SNPs analizados presenta un efecto protector frente a la enfermedad de Crohn. En el caso de la colitis ulcerosa observamos una tendencia similar, pero en este caso la asociación no llega a ser significativa. Simultánea y posteriormente a la realización de nuestro estudio han aparecido numerosos trabajos que describen una asociación del gen *IL23R* tanto con la enfermedad de Crohn (50, 53, 55-57) como con la colitis ulcerosa (59-63, 68). Todos estos estudios, incluido el nuestro, han permitido concluir que *IL23R* es uno de los genes claramente asociados a la EII. Esta asociación no se ha replicado en población japonesa, en la cual el marcador rs11209026 no es polimórfico (178), pero sí en población coreana (yang sk, ibd 2009), por lo que no parece ser específica de la población caucásica. Las “odds ratio” descritas en estos trabajos apuntan a que el efecto de este gen es mayor en Crohn que en colitis, lo que podría explicar por qué nosotros no observamos una asociación con esta última. De hecho, si calculamos la potencia de nuestro estudio teniendo en cuenta la “odds ratio” descrita para el polimorfismo rs11209026 en un “genome-wide” (60) llevado a cabo en enfermos de CU (OR= 0.53), ésta sería del 70%.

Cuando analizamos los haplotipos conformados por ambos SNPs para tratar de discernir si se trata de dos señales independientes, encontramos un elevado desequilibrio de ligamiento entre ellos ( $D'=0.78$ ,  $r^2=0.05$ ), como indica la figura 20; de manera que el alelo G del SNP rs7517847 prácticamente siempre va con el alelo A del SNP rs11209026, lo que no nos permite saber cuál de las asociaciones es primaria y cual secundaria. Como hemos mencionado anteriormente, en el estudio original ambas señales se consideraban independientes debido a la baja correlación existente entre los dos polimorfismos, sin embargo esto no siempre es así ya que dos SNPs pueden estar pobremente correlacionados y sin embargo estar marcando un mismo efecto, por ejemplo, un tercer SNP.



**Figura 20.** Desequilibrio de ligamiento entre los dos SNPs analizados en *IL23R* (el color representa el valor de  $D'$  y la numeración indica el valor de  $r^2$ ).

Se cree que el polimorfismo rs11209026 podría ser la variante etiológica ya que su asociación con la EII se ha replicado en numerosas ocasiones y además se trata de un SNP no sinónimo que da lugar al cambio Arg381Gln. Sin embargo, hasta la fecha no se ha publicado ningún estudio que demuestre que este SNP tenga una repercusión en la función de IL-23R. Es poco probable que otro SNP sea el responsable del efecto observado ya que esta región ha sido estudiada en profundidad, pero si quizá otro tipo de polimorfismo genético, como un microsatélite o una delección/inserción.

Junto con el gen *IL23R* decidimos analizar el papel del gen ***IL12B*** en la EII ya que este último codifica la subunidad p40 compartida por las citoquinas IL-12 e IL-23. Para ello analizamos dos polimorfismos localizados en este gen, uno en la región 3' UTR (rs3212227) previamente relacionado con un aumento en la secreción de IL-12, pero no asociado a la EII (190) y otro (rs6887695) seleccionado por su moderada correlación con el primero ( $r^2 = 0.29$ ).

El polimorfismo en la región 3' UTR no aparecía asociado a la EII en nuestro estudio, coincidiendo con los resultados del estudio original; sin embargo, el otro SNP aparecía asociado a la colitis ulcerosa observándose una tendencia similar para la EC, pero sin llegar a

ser significativa. Mientras llevábamos a cabo este estudio apareció un trabajo en el que encontraban varios SNPs del gen *IL12B*, entre ellos el rs6887695, asociados a la EC (116). Posteriormente, otro trabajo encontró asociación de este mismo SNP, entre otros, con la colitis ulcerosa (60). Por lo tanto, los diferentes estudios, incluyendo el nuestro, indican que el gen *IL12B* es un gen de susceptibilidad común a Crohn y colitis. Como ocurría con el gen *IL23R*, no existen estudios funcionales que indiquen cuál es el polimorfismo responsable de la asociación observada.

Por otro lado, analizamos la posible interacción epistática entre los genes *IL23R* e *IL12B*, previamente descrita en psoriasis (191). Con nuestros datos, no encontramos signos de interacción entre ellos. Sin embargo, como hemos comentado anteriormente, podría deberse a una falta de potencia estadística.

Por tanto, tanto el ligando como el receptor parecen estar implicados en la enfermedad inflamatoria intestinal, pero no parece existir una interacción entre ambos genes. Además, el gen *IL23R* parece ser un factor de susceptibilidad compartido por numerosas enfermedades autoinmunes, ya que también está asociado con la acalasia idiopática (192), la sarcoidosis (193) y la enfermedad de Behçet (194).

#### 4.4 Genes que codifican factores de transcripción: *NKX2-3*, *PXR*, *STAT4* y *STAT3*.

Como se indica en la tabla 14, dentro del gen *NKX2-3* analizamos dos marcadores y encontramos que la frecuencia del genotipo rs10883365\_AA era significativamente mayor en los enfermos de colitis ulcerosa que en los controles. El otro SNP estudiado en este gen no mostró asociación.

En esta tabla también se puede observar que ninguno de los tres polimorfismos analizados en el gen *PXR* se asociaba con la enfermedad de Crohn ni con la colitis ulcerosa.

**Tabla 14.** Frecuencias genotípicas y alélicas de los marcadores analizados en los "loci" *NKX2-3* y *PXR* en enfermedad de Crohn, colitis y controles sanos.

		EC	CU	Controles		EC	CU	Controles
	Genotipos	n (%)	n (%)	n (%)	Alelos	n (%)	n (%)	n (%)
NKX2-3								
	AA *	124 (30.3)	139 (31.7)	254 (26.4)	A	452 (55.3)	481 (54.8)	999 (51.9)
	AG	204 (49.9)	203 (46.2)	491 (51.0)	G	366 (44.7)	397 (45.2)	925 (48.1)
rs10883365	GG	81 (19.8)	97 (22.1)	217 (22.6)				
	AA	238 (58.3)	257 (58.7)	529 (55.1)	A	626 (76.7)	669 (76.4)	1418 (73.8)
	AG	150 (36.8)	155 (35.4)	360 (37.5)	G	190 (23.3)	207 (23.6)	502 (26.2)
rs888208	GG	20 (4.9)	26 (5.9)	71 (7.4)				
PXR								
	CC	112 (34.8)	126 (34.5)	219 (39.8)	C	378 (58.7)	434 (59.5)	680 (61.8)
	CT	154 (47.8)	182 (49.9)	242 (44.0)	T	266 (41.3)	296 (40.5)	420 (38.2)
rs3814055	TT	56 (17.4)	57 (15.6)	89 (16.2)				
	CC	101 (30.5)	112 (31.0)	173 (31.7)	C	375 (56.7)	401 (55.5)	621 (56.9)
	CG	173 (52.3)	177 (49.0)	275 (50.4)	G	287 (43.3)	321 (44.5)	471 (43.1)
rs6784598	GG	57 (17.2)	72 (19.9)	98 (18.0)				
	CC	202 (62.7)	238 (65.9)	356 (64.8)	C	514 (79.8)	587 (81.3)	887 (80.8)
	CT	110 (34.2)	111 (30.8)	175 (31.9)	T	130 (20.2)	135 (18.7)	211 (19.2)
rs2276707	TT	10 (3.1)	12 (3.3)	18 (3.3)				

\* AA vs. AG+GG, CU vs. controles: p= 0.04; OR (95% IC)= 1.29 (1.00-1.67).

No obstante, como se recoge en la tabla 15, al estratificar los polimorfismos localizados en el gen *PXR* de acuerdo con el fenotipo clínico observamos una diferencia estadísticamente significativa entre los enfermos de colitis ulcerosa con la forma extensa de la enfermedad y aquellos que presentan la forma izquierda de la misma. Al comparar cada uno de estos subgrupos con los controles se observó que la frecuencia de portadores del alelo minoritario rs3814055\_T estaba significativamente aumentada con respecto a controles únicamente en los enfermos con colitis extensa.

**Tabla 15.** Frecuencias genotípicas y alélicas de los marcadores analizados en el gen *PXR* en enfermos de colitis extensa e izquierda y en controles sanos.

		CU extensa	CU izquierda	Controles
		n (%)	n (%)	n (%)
<b><i>PXR</i></b>				
<b>rs3814055 *</b>	CC	38 (27.7)	70 (38.2)	219 (39.8)
	CT	77 (56.2)	83 (45.4)	242 (44.0)
	TT	22 (16.1)	30 (16.4)	89 (16.2)
	C	153 (55.8)	223 (60.9)	680 (61.8)
	T	121 (44.2)	143 (39.1)	420 (38.2)
<b>rs6784598</b>	CC	42 (31.6)	57 (31.3)	173 (31.7)
	CG	68 (51.1)	91 (50.0)	275 (50.4)
	GG	23 (17.3)	34 (18.7)	98 (18.0)
	C	152 (57.1)	205 (56.3)	621 (56.9)
	G	114 (42.9)	159 (43.7)	471 (43.1)
<b>rs2276707</b>	CC	84 (63.2)	123 (66.9)	356 (64.8)
	CT	44 (33.1)	57 (31.0)	175 (31.9)
	TT	5 (3.8)	4 (2.1)	18 (3.3)
	C	212 (79.7)	303 (82.3)	887 (80.8)
	T	54 (20.3)	65 (17.7)	211 (19.2)

\* CT+TT vs. CC, CU extensa vs. CU izquierda: p= 0.05.

CU extensa vs. controles: p= 0.009; OR (95% IC)= 1.72 (1.12-2.66).

CU izquierda vs. controles: p= 0.71; OR (95% IC)= 1.07 (0.75-1.53).

El análisis de los haplotipos formados por estos polimorfismos en los pacientes de colitis extensa y en los controles se presenta en la tabla 16. Al comparar las frecuencias haplotípicas entre enfermos y controles se encontraron dos haplotipos de protección (CCC y TGC) y uno de susceptibilidad (TCC). Además, entre estos dos últimos haplotipos, ambos con el alelo de riesgo rs3814055\_T, encontramos una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.003$ ), lo cual parece indicar que el haplotipo de riesgo TCC marca mejor el efecto observado que el alelo rs3814055\_T.

**Tabla 16.** Frecuencias de los haplotipos formados por los polimorfismos analizados en el gen *PXR* en enfermos de colitis extensa y en controles.

	CU extensa	Controles
rs3814055/rs6784598/rs2276707	n (%)	n (%)
CCC <sup>1</sup>	78 (30.5)	410 (38.0)
TCC <sup>2</sup>	71 (27.7)	202 (18.7)
CGC	45 (17.6)	168 (15.6)
TGT	32 (12.5)	114 (10.6)
TGC <sup>3</sup>	12 (4.7)	91 (8.4)
CGT	18 (7.0)	93 (8.6)

<sup>1</sup> CU extensa vs. controles:  $p=0.02$ ; OR (95% IC)= 0.71 (0.53-0.97).

<sup>2</sup> CU extensa vs. controles:  $p=0.001$ ; OR (95% IC)= 1.66 (1.20-2.30).

<sup>3</sup> CU extensa vs. controles:  $p=0.04$ ; OR (95% IC)= 0.53 (0.27-1.02).

Finalmente, decidimos estudiar si existe interacción epistática entre los genes *PXR* y *MDR1*. Para ello comprobamos si el efecto del alelo rs3814055\_T observado en los pacientes de colitis extensa, depende del genotipo presente en alguno de los tres polimorfismos del gen *MDR1* asociados a EII, rs1045642, rs2032582 y rs3789243. Como se muestra en la tabla 17, al estratificar los enfermos por el genotipo del marcador rs3789243 encontramos diferencias significativas entre los tres grupos de enfermos. Además, al comparar cada uno de estos grupos con los controles observamos que ser portador del alelo rs3814055\_T en el gen *PXR* no confiere susceptibilidad a los pacientes con colitis extensa que no presentan el alelo rs3789243\_A en el gen *MDR1* [OR (95% IC)= 0.88 (0.42-1.86);  $p=0.72$ ]. Sin embargo sí confiere susceptibilidad a los pacientes heterocigotos para el alelo rs3789243\_A [OR (95% IC)=

2.12 (1.12-4.06);  $p= 0.013$ ], siendo esta susceptibilidad mayor en los homocigotos [OR (95% IC)= 13.89 (2.20-577.17);  $p= 0.009$ ].

**Tabla 17.** Análisis de la interacción epistática entre los genes *PXR* y *MDR1* en enfermos con colitis extensa.

		<b>MDR1 rs3789243</b>		
		GG	GA	AA
<b>PXR rs3814055</b>	CT+TT *	20 (57.2)	48 (76.2)	21 (95.4)
	CC	15 (42.9)	15 (23.8)	1 (4.6)

\* GG vs. GA:  $p= 0.05$ .

GG vs. AA:  $p= 0.002$ .

GA vs. AA :  $p= 0.04$ .

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos analizados en los “loci” *STAT4* y *STAT3* se muestran en la tabla 18.

Como se puede observar, el polimorfismo analizado en el gen ***STAT4*** mostraba asociación tanto con la enfermedad de Crohn como con la colitis ulcerosa, de manera que la frecuencia del alelo minoritario se encontraba significativamente incrementada en enfermos comparados con controles.

Tres de los cuatro marcadores analizados en la región donde se localiza el gen ***STAT3*** aparecían asociados a la enfermedad inflamatoria intestinal. La frecuencia del alelo rs1026916\_A era significativamente menor en los enfermos de colitis ulcerosa que en los controles mientras que el alelo rs12948909\_C mostraba un efecto protector únicamente en los enfermos de Crohn. Finalmente, en el caso del alelo rs744166\_G, esta frecuencia se encontraba significativamente disminuida tanto en Crohn como en colitis.

**Tabla 18.** Frecuencias genotípicas y alélicas de los marcadores analizados en los "loci" *STAT4* y *STAT3* en enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y controles sanos.

		EC	CU	Controles		EC	CU	Controles
	Genotipos	n (%)	n (%)	n (%)	Alelos	n (%)	n (%)	n (%)
<b>STAT4</b>								
<b>rs7574865</b>	GG	191 (59.3)	209 (59.4)	470 (65.6)	G T <sup>1</sup>	494 (76.7)	541 (76.9)	1160 (81.0)
	GT	112 (34.8)	123 (39.9)	220 (30.7)		150 (23.3)	163 (23.1)	272 (19.0)
	TT	19 (5.9)	20 (5.7)	26 (3.6)				
<b>STAT3</b>								
<b>rs12948909</b>	AA	227 (59.0)	235 (53.1)	397 (50.5)	A C <sup>2</sup>	590 (76.6)	637 (71.9)	1118 (71.1)
	AC	136 (35.3)	167 (37.7)	324 (41.2)		180 (23.4)	249 (28.1)	454 (28.9)
	CC	22 (5.7)	41 (9.3)	65 (8.3)				
<b>rs1026916</b>	GG	166 (42.1)	211 (48.0)	303 (38.4)	G A <sup>3</sup>	517 (65.6)	609 (69.2)	988 (62.5)
	GA	185 (47.0)	187 (42.5)	382 (48.4)		271 (34.4)	271 (30.8)	592 (37.5)
	AA	43 (10.9)	42 (9.5)	105 (13.3)				
<b>rs744166</b>	AA	149 (37.8)	179 (40.5)	274 (34.5)	A G <sup>4</sup>	489 (62.1)	560 (63.4)	920 (57.9)
	AG	191 (48.5)	202 (45.7)	372 (46.8)		299 (37.9)	324 (36.7)	670 (42.1)
	GG	54 (13.7)	61 (13.8)	149 (18.7)				
<b>rs3809758</b>	CC	267 (65.4)	292 (65.2)	487 (62.5)	C T	652 (79.9)	731 (81.6)	1230 (79.0)
	CT	118 (28.9)	147 (32.8)	256 (32.9)		164 (20.1)	165 (18.4)	328 (21.0)
	TT	23 (5.6)	9 (2.0)	36 (4.6)				

<sup>1</sup> T vs. G, EC vs. controles: p=0.024; OR (95% IC)= 1.29 (1.03-1.63);

CU vs. controles: p=0.025; OR (95% IC)= 1.28 (1.03-1.61);

<sup>2</sup> C vs. A, EC vs. controles: p=0.005; OR (95% IC)= 0.75 (0.61-0.92);

<sup>3</sup> A vs. G, CU vs. controles: p=0.001; OR (95% IC)= 0.74 (0.62-0.89);

<sup>4</sup> G vs. A, EC vs. controles: p=0.05; OR (95% IC)= 0.84 (0.70-1.00);

CU vs. controles: p=0.008; OR (95% IC)= 0.79 (0.67-0.94);

Dado que el polimorfismo rs1026916 se asocia a colitis (el  $r^2$  entre los polimorfismos rs1026916 y rs744166 es bastante elevado, 0.8) y el polimorfismo rs12948909 se asocia a Crohn, decidimos analizar los haplotipos formados por ambos marcadores para determinar si ambos efectos son independientes. Como se puede observar en la tabla 19, cuando realizamos este análisis encontramos un haplotipo de susceptibilidad (AG) para Crohn y colitis, un haplotipo de protección (AA) solo para colitis y un haplotipo de protección para ambas enfermedades (CA). Además, encontramos que la frecuencia del haplotipo CG era significativamente diferente entre los enfermos de Crohn y los enfermos de colitis (p= 0.003).



**Tabla 19.** Frecuencias de los haplotipos formados por los polimorfismos rs12948909 y rs1026916 en enfermedad de Crohn, colitis y controles sanos.

	EC	CU	Controles
rs12948909/rs1026916	n (%)	n (%)	n (%)
<b>AG</b> <sup>1</sup>	444 (55.6)	483 (54.4)	813 (50.4)
<b>AA</b> <sup>2</sup>	166 (20.8)	156 (17.5)	334 (20.7)
<b>CA</b> <sup>3</sup>	109 (13.6)	119 (13.4)	270 (16.8)
<b>CG</b>	79 (9.9)	131 (14.7)	195 (12.1)

<sup>1</sup> EC vs. controles: p= 0.016; OR (95% IC)= 1.23 (1.04-1.47)

CU vs. controles : p= 0.04; OR (95% IC)= 1.19 (1.00-1.40)

<sup>2</sup> CU vs. controles: p= 0.04; OR (95% IC)= 0.80 (0.65-1.00)

<sup>3</sup> EC vs. controles: p= 0.05; OR (95% IC)= 0.79 (0.61-1.01)

CU vs. controles: p= 0.04; OR (95% IC)= 0.78 (0.62-1.00)

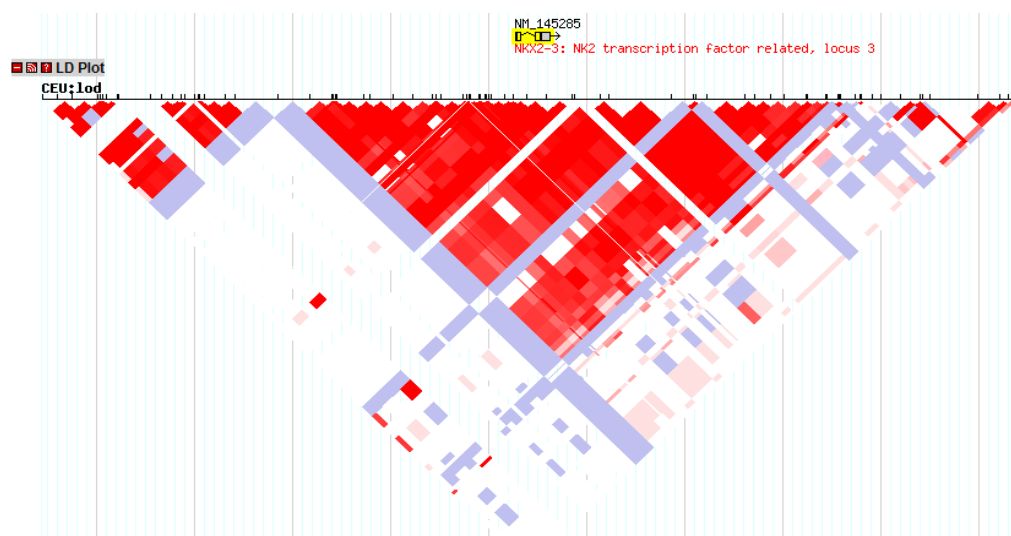
Entre los genes que codifican factores de transcripción que han sido objeto de nuestro estudio, dos de ellos, *NKX2-3* y *STAT3*, se habían visto asociados previamente a la enfermedad de Crohn en estudios de barrido genómico. En el caso de los genes *STAT4* y *PXR*, en este trabajo analizamos por primera vez su papel en la EII, el primero de ellos previamente asociado a otras enfermedades autoinmunes.

La región 10q24 se encontró asociada a la EC en un estudio de barrido genómico (50). La señal de asociación más fuerte se debía al polimorfismo rs10883365, localizado a 5 kb del origen de transcripción del gen *NKX2-3*. Decidimos analizar este SNP y otro adicional, situado en la región 3'UTR del gen, en nuestra muestra de enfermos y controles, con la finalidad de replicar la asociación observada y determinar si se trata de un gen de susceptibilidad específico de la EC o es común a ambas formas de la EII.

Al realizar este estudio observamos que el genotipo rs10883365\_AA muestra una ligera asociación con la colitis ulcerosa, pero no con la enfermedad de Crohn. Nuestros resultados parecen indicar que este gen es específico de la colitis ulcerosa, aunque no nos permiten sacar conclusiones definitivas ya que la asociación que observamos es bastante débil. Con posterioridad a nuestro análisis, distintos estudios han detectado señales de asociación tanto con la EC (66, 116) como con la CU (60, 183), considerándose actualmente

uno de los genes de susceptibilidad comunes a ambas patologías. Se ha descrito que este SNP tiene un efecto más marcado en la colitis ulcerosa que en la EC (183) de manera que si calculamos la potencia de nuestro estudio para detectar la “odds ratio” descrita para la colitis ulcerosa ( $OR=1.39$ ) y para la enfermedad de Crohn ( $OR=1.22$ ), sería superior al 80% en el primer caso, pero disminuiría hasta un 64% en el segundo, lo que podría explicar por qué no observamos asociación con la EC pero sí con la CU. De hecho, en nuestra muestra, la enfermedad de Crohn presenta una tendencia similar a la colitis ulcerosa, de manera que podríamos unir ambas y aumentar así la potencia. Al hacer esto observamos que el genotipo rs10883365\_AA presenta asociación con la enfermedad inflamatoria intestinal global [ $p= 0.03$ ;  $OR(95\% IC)= 1.25 (1.02-1.55)$ ]. Curiosamente, en otra enfermedad intestinal como es la celiaquía no se ha observado que el gen *NKX2-3* influya en la susceptibilidad a padecer tal enfermedad (195).

En prácticamente todos los estudios de barrido genómico en los que se ha encontrado asociación de la región 10q24 con la EII, la señal más fuerte correspondía al rs10883365 y además, este polimorfismo se asocia a la patología en distintos grupos étnicos (181). Sin embargo, resulta difícil determinar si se trata de la variante etiológica, ya que esta región presenta un elevado desequilibrio de ligamiento (figura 21). Al igual que en otros casos, serían necesarios estudios que permitan relacionar esta variante con alteraciones en la funcionalidad del gen, pero hasta el momento no se ha llevado a cabo ningún análisis de este tipo.



**Figura 21.** Desequilibrio de ligamiento en la región 10q14 (figura obtenida de [www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)). Los colores indican el valor del coeficiente  $D'$ , desde  $D'=1$  (rojo) hasta  $D'=0$  (blanco).

Aunque no se conoce la verdadera variante etiológica, parece que, dentro de la región 10q24, *NKX2-3* es el único gen que podría tener un papel en la enfermedad inflamatoria intestinal ya que interviene en el desarrollo del bazo y de las placas de Peyer y afecta a la maduración de las células B y a la respuesta inmune dependiente de células T (142, 143). Además, este gen parece ser necesario para la expresión de MAdCAM-1 (“mucosal vascular addressin cell adhesión molecule 1”), una molécula de adhesión que es fundamental para el “homing” de linfocitos al intestino (196). Existen estudios que demuestran que la expresión de esta molécula de adhesión se encuentra aumentada en focos de inflamación intestinal, tanto en modelos animales (197) como en muestras de tejido procedentes de pacientes de Crohn y colitis (198). A través de la regulación de MAdCAM-1, *NKX2-3* podría intervenir en la migración de los linfocitos al intestino y de esta manera influir en la respuesta inflamatoria intestinal.

Por lo tanto, nuestro trabajo junto con otros estudios corroboran la asociación de la región 10q24 con la enfermedad inflamatoria intestinal y, actualmente, se considera uno de los “loci” definitivamente asociados a esta patología.

El gen *PXR* se vió implicado por primera vez en la enfermedad inflamatoria intestinal en un estudio de asociación llevado a cabo en población irlandesa (151). De los 8 polimorfismos que analizaron, seleccionados por su posible papel funcional, cuatro estaban asociados a la EII, siendo dos de ellos prácticamente equivalentes. Posteriormente, un estudio realizado en población escocesa (152), en el que analizaban uno de estos SNPs equivalentes, no replicó esta asociación. Para tratar de determinar si el gen *PXR* tiene alguna implicación en la EII decidimos analizar tres de los cuatro SNPs previamente asociados a la EII en el estudio irlandés, rs3814055 (-25385 C/T), rs6784598 (7158 C/G) y rs2276707 (8055 C/T), descartando uno de los dos SNPs equivalentes.

Al llevar a cabo el estudio caso-control, ninguno de los SNPs analizados mostraba asociación con la EC o la CU. Sin embargo, al estratificar por formas clínicas, observamos que ser portador del alelo minoritario del polimorfismo localizado en el promotor (-25385\_T) confiere susceptibilidad a la forma extensa de la colitis ulcerosa.

Al estudiar los haplotipos formados por los tres polimorfismos encontramos un haplotipo de susceptibilidad a la colitis extensa (TCC) y dos haplotipos de protección (CCC y TGC). Sin embargo, el efecto de los dos haplotipos protectores parece ser secundario al del haplotipo de riesgo, ya que si analizamos el efecto de uno y otro, eliminando el haplotipo TCC,

ya no se observa una diferencia significativa entre enfermos y controles ( $p=0.25$  para CCC y  $p=0.10$  para TGC). A pesar de que en el análisis individual de cada SNP vemos que el alelo -25385\_T confiere riesgo, del estudio de haplotipos se deduce que este alelo no parece ser el responsable del efecto observado, ya que el haplotipo TGC, que también lleva este alelo en esa posición, muestra la tendencia contraria. Además, cuando comparamos la frecuencia de ambos haplotipos encontramos una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.01$ ). Probablemente el haplotipo TCC esté en desequilibrio de ligamiento con alguna variante que es la que realmente confiere susceptibilidad.

Por tanto, como se había descrito con anterioridad, el gen *PXR* parece tener una implicación en la EI. Sin embargo, nuestro resultado contradice el hallado inicialmente en población irlandesa (151), ya que en este estudio era el alelo mayoritario el que confería susceptibilidad. Esta diferencia de resultados entre ambos estudios podría reflejar la existencia de heterogeneidad entre ellos, ya que las frecuencias alélicas y genotípicas de ambas poblaciones difieren bastante. De hecho, si llevamos a cabo un meta-análisis incluyendo estos dos estudios encontramos una elevada heterogeneidad entre la población irlandesa y la española, tanto en la comparación entre enfermos de Crohn y controles ( $Q=13.66$ ;  $I^2=93\%$ ) como entre enfermos de colitis y controles ( $Q=12.25$ ;  $I^2=92\%$ ). Como el estudio de haplotipos parece indicar que el SNP -25385C/T es únicamente un marcador genético, podríamos considerar que la heterogeneidad existente se debe a una diferencia en la estructura de los haplotipos entre poblaciones, es decir, mientras que en nuestra población la variante de riesgo podría estar en desequilibrio de ligamiento con el alelo -25385\_T, en población irlandesa lo estaría con el alelo C. En cuanto al estudio realizado en la población escocesa (152), curiosamente, las frecuencias alélicas y genotípicas descritas en el estudio escocés son muy similares a las nuestras y ambas poblaciones son completamente homogéneas. En este caso, el hecho de que en población escocesa no se observe asociación con la colitis ulcerosa extensa podría deberse a la baja potencia estadística que conllevan los estudios estratificados.

Finalmente, analizamos la interacción epistática entre los genes *PXR* y *MDR1*, dado que ambos están implicados en el metabolismo de xenobióticos y el primero regula la expresión del segundo. Observamos que la susceptibilidad que confiere el alelo -25385\_T a los enfermos de CU extensa depende del genotipo presente en el polimorfismo intrónico rs3789243 del gen *MDR1*. La detección de este tipo de interacciones, así como de interacciones gen-ambiente, son esenciales para avanzar en el conocimiento de la base genética de las enfermedades complejas y en muchas ocasiones su existencia puede ser la

causa de que aparezcan resultados contradictorios entre estudios.

Según nuestros datos, el gen *PXR* influye en la susceptibilidad a padecer colitis ulcerosa extensa, siendo este efecto dependiente del gen *MDR1*. La variante implicada parece ser únicamente un marcador genético en desequilibrio de ligamiento con la variante causal, sin embargo no se ha llevado a cabo ningún estudio profundo de la región que permita determinar cual es la variante responsable del efecto observado.

En un estudio de múltiples SNPs en la región candidata 2q, llevado a cabo en pacientes con artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico, se encontró una señal de asociación en un bloque de desequilibrio de ligamiento que se extiende desde el gen *STAT1* hasta el gen ***STAT4*** (155). El mapeo fino de esta región de 209 kb permitió la identificación de un haplotipo de riesgo formado por 4 polimorfismos, prácticamente equivalentes entre si ( $r^2 > 0.97$ ), marcado por el polimorfismo rs7574865. Posteriormente, este SNP, localizado en el tercer intrón del gen *STAT4*, se ha visto asociado a la AR y al lupus en otros estudios (199) y al síndrome de Sjögren (200).

El factor de transcripción *STAT4* transduce señales mediadas por citoquinas tales como IL-12, IL-23 e interferón tipo 1, participando en la diferenciación de las células Th1 y Th17, la activación de monocitos, y la producción de IFN- $\gamma$  (153, 201). Por tanto, su función, junto con el hecho de que se haya visto asociado a otras enfermedades autoinmunes, lo convierte en un buen candidato para analizar su papel en la EII. Por ello analizamos el SNP asociado en los estudios previos en nuestras muestras de enfermos y controles. Cuando comparamos las frecuencias alélicas y genotípicas entre ambos grupos, observamos que el alelo T confiere susceptibilidad tanto a la enfermedad de Crohn como a la colitis ulcerosa, con un efecto similar en ambas.

Con posterioridad a nuestro estudio han aparecido dos trabajos que analizan este mismo polimorfismo en la EII, uno llevado a cabo en población alemana (202) y otro en población española (203). Sin embargo, los resultados encontrados han resultado contradictorios. Por un lado, el estudio realizado en población alemana encuentra asociación del alelo rs7574865\_T con la EC pero, a diferencia de nuestro resultado, este alelo muestra un efecto protector. Por otro lado, el estudio realizado en población española no observa asociación con la EC pero sí con la CU y en el mismo sentido que nuestro estudio, es decir, con un efecto de susceptibilidad del alelo T. Si llevamos a cabo un meta-análisis incluyendo los tres estudios, observamos una elevada heterogeneidad entre nuestro estudio y los otros dos

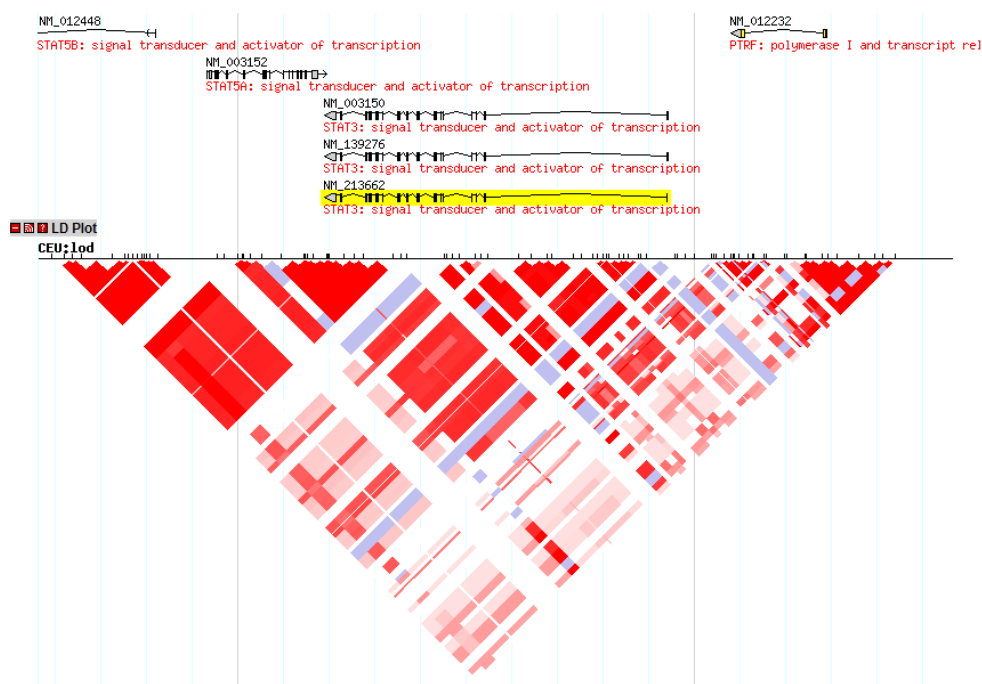
cuando comparamos los enfermos de Crohn y los controles ( $p < 0.01$ ,  $I^2 > 80\%$ ). Sin embargo, cuando comparamos los enfermos de colitis y los controles, observamos heterogeneidad entre el estudio alemán y los dos estudios españoles ( $p < 10^{-4}$ ,  $I^2 = 99\%$ ). Las discrepancias halladas entre los estudios podrían deberse a una diferencia en las características clínicas de los pacientes, de hecho el estudio realizado en población alemana describe una asociación con los enfermos de Crohn colónico y con la edad de debut temprano. Es posible que la mayor o menor proporción de este grupo específico de pacientes en los distintos estudios sea la causa de la heterogeneidad observada. Por otro lado, en las demás enfermedades autoinmunes el efecto coincide con el observado en nuestro estudio, es decir, el alelo minoritario T confiere susceptibilidad a las distintas patologías, lo que confiere verosimilitud a nuestros resultados.

Existen diversos estudios en pacientes que apoyan el papel de *STAT4* en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal. Por un lado, se ha demostrado que existe una activación constitutiva de *STAT4* en las células T intestinales de enfermos de Crohn (204) y que la señalización IL-12 mediada por *STAT4* se encuentra aumentada en pacientes de colitis (205). Además, se ha descrito que las distintas isoformas de *STAT4* regulan diferencialmente la producción de citoquinas Th1 lo cual afecta a la severidad de la EII (206). Por otro lado, recientemente se ha otorgado a este factor de transcripción un papel en el desarrollo de las células T reguladoras (207).

Por tanto, los estudios funcionales apoyan el papel de este factor de transcripción en la EII. Además, con posterioridad a nuestro estudio, se ha descrito su asociación con otras tres enfermedades autoinmunes, concretamente esclerosis sistémica (208), psoriasis (209) y diabetes tipo 1 (210), y en distintas etnias (211, 212). Sin embargo, los estudios genéticos arrojan resultados controvertidos en cuanto a su posible implicación en la EII, mostrando una elevada heterogeneidad entre ellos que impide sacar conclusiones definitivas. Aunque nuestros resultados indican que *STAT4* es un gen de susceptibilidad común a la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, son necesarios más estudios de replicación en distintas poblaciones.

La región 17q21 donde se localiza el gen ***STAT3***, representada en la figura 22, se ha visto asociada a la enfermedad inflamatoria intestinal en diversos estudios, sin embargo los resultados son algo contradictorios. Un estudio de barrido genómico (50), llevado a cabo en individuos del Reino Unido, fue el primero en describir una asociación entre un polimorfismo localizado en un intrón del gen *STAT3* (rs3816769) y la enfermedad de Crohn. Más tarde, un meta-análisis de varios estudios de barrido genómico confirmó esta asociación (66),

concretamente del SNP rs744166, localizado también en un intrón del gen. Sin embargo, en población alemana se describió que este mismo polimorfismo se asociaba únicamente a la colitis ulcerosa (183). Recientemente, otro estudio llevado a cabo en el Reino Unido ha descrito una asociación del SNP rs12948909, localizado en el gen *PTRF* adyacente a *STAT3*, con la colitis (213). Los estudios en las distintas poblaciones arrojan resultados discordantes, por lo que nos propusimos analizar el papel de la región 17q21 en nuestra muestra de enfermos y controles. Para ello seleccionamos 4 polimorfismos, dos previamente asociados a la EC y la CU (rs744166 y rs12948909) y otros dos SNPs adicionales (rs1026916 y rs3809758), con la finalidad de establecer haplotipos e intentar obtener más información.



**Figura 22.** Desequilibrio de ligamiento en la región 17q21 (figura obtenida de [www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)). Los colores indican el valor del coeficiente  $D'$ , desde  $D'=1$  (rojo) hasta  $D'=0$  (blanco).

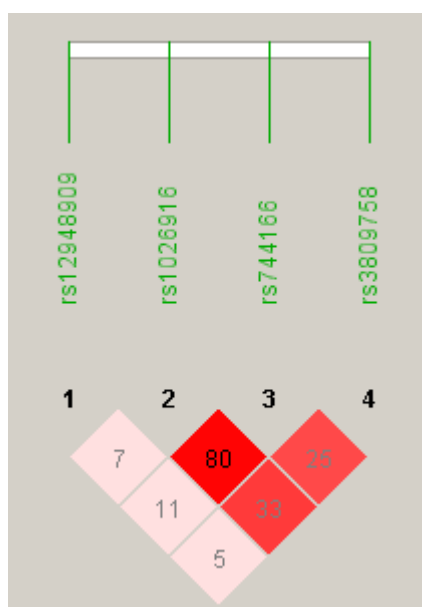
Tres de los polimorfismos analizados se encuentran asociados a la enfermedad inflamatoria intestinal en nuestra población. Concretamente, los alelos minoritarios rs12948909\_C, rs1026916\_A y rs744166\_G confieren susceptibilidad a la enfermedad de Crohn, a la colitis y a ambas, respectivamente.

El análisis de los haplotipos formados por estos cuatro marcadores, llevado a cabo con

el fin de recoger una mayor variabilidad de la región, no aportó información adicional. Posteriormente, para tratar de discernir si el efecto de los polimorfismos rs12948909, asociado a Crohn, y rs1026916, asociado a colitis, era independiente, decidimos construir haplotipos con estos dos marcadores. Observamos un haplotipo de susceptibilidad, AG, común a Crohn y colitis y dos haplotipos de protección, CA, común a ambas enfermedades ya que lleva los alelos contrarios al haplotipo de susceptibilidad, y AA, específico de la colitis ulcerosa. Sin embargo, este efecto protector podría ser secundario al de susceptibilidad, ya que la frecuencia de los haplotipos AA y CA deja de ser significativamente diferente entre enfermos y controles (CU vs. controles:  $p = 0.26$ , para AA; EC vs. controles:  $p = 0.32$  y CU vs. controles:  $p = 0.12$ , para CA) si se elimina el haplotipo AG en esta comparación. Encontramos también que la frecuencia del haplotipo CG es significativamente diferente entre los enfermos de Crohn y de colitis ( $p = 0.003$ ). La magnitud del efecto del haplotipo AG es muy similar a la de los SNPs individuales, lo que podría sugerir un efecto independiente en ambas enfermedades ya que, en caso contrario, esperaríamos observar un efecto sinérgico o aditivo del haplotipo AG.

Atendiendo al bajo desequilibrio de ligamiento entre los marcadores asociados (figura 23), podríamos postular la existencia de dos polimorfismos etiológicos en el mismo gen o en genes diferentes, de manera que, en la población española, uno presentaría un desequilibrio de ligamiento más alto con el rs12948909 y proporcionaría susceptibilidad a la enfermedad de Crohn, y otro tendría mayor desequilibrio de ligamiento con el SNP rs1026916 y proporcionaría susceptibilidad a la colitis ulcerosa. El SNP rs744166 al estar correlacionado con ambos SNPs ( $r^2 = 0.8$  con rs1026916 y  $r^2 = 0.11$  con rs12948909), aparece asociado tanto a Crohn como a colitis aunque la asociación con la colitis es más clara porque el desequilibrio con el rs1026916 es más alto. Un ejemplo de distintos polimorfismos en un “locus” que se asocian de manera específica a la enfermedad de Crohn o a la colitis ulcerosa lo encontramos en la región HLA en la que distintos alelos se asocian a Crohn y a colitis, e incluso a los subtipos clínicos de éstas (45, 46, 214). Al ser estos polimorfismos meros marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con la variante etiológica, las diferencias entre poblaciones podrían ser las responsables de las discrepancias observadas entre los distintos estudios que han analizado el papel de *STAT3*.





**Figura 23.** Desequilibrio de ligamiento entre los cuatro SNPs analizados en la región 17q21 (el color representa el valor de  $D'$  y la numeración indica el valor de  $r^2$ ).

Existen numerosos estudios que apoyan el papel de STAT3 en la inflamación intestinal crónica. Así, en regiones intestinales inflamadas de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal se ha observado una activación de STAT3 en diferentes tipos celulares, incluyendo células T y células epiteliales. Además, la cantidad total de la proteína se encuentra aumentada en enfermos de Crohn y colitis comparados con controles sanos(204). Con posterioridad a nuestro estudio, se ha descrito una asociación de esta región con la enfermedad de Crohn en población japonesa (215) y en enfermos pediátricos (216).

Sin embargo, como en otros casos, el papel exacto de STAT3 en la EII permanece sin esclarecer, ya que este factor de transcripción es utilizado por citoquinas con papeles muy diversos, como IL-23, IL-22, IL-6 o IL-10 y además su función depende del tipo celular en que se exprese (217). Como hemos visto anteriormente, IL-23 parece tener un papel en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal promoviendo la diferenciación de las células Th17 las cuales producen citoquinas inflamatorias (132). Por otro lado, la activación de STAT3 a través de IL-22 participa en la regulación de la homeostasis intestinal y se ha observado que la expresión de IL-22 se encuentra aumentada en biopsias de tejido intestinal

inflamado procedentes de pacientes de Crohn y colitis (218). STAT3 también es parte de otras rutas como la de IL-10, por lo que desempeña un importante papel anti-inflamatorio (219). De hecho, los ratones que carecen de la expresión de *stat3*, específicamente en macrófagos y neutrófilos, desarrollan enterocolitis espontánea debido en parte a la pérdida de los efectos supresores mediados por IL-10 sobre la producción de citoquinas proinflamatorias (220). Además, IL-6 ha sido tradicionalmente considerada como un promotor de la respuesta de fase aguda y de la inflamación, así, la pérdida o el bloqueo de la señalización de IL-6 en distintos modelos de ratón atenúa la colitis (221). Esto da una idea de que el papel que desempeña STAT3 en la EII puede ser bastante complejo.



## **5. CONCLUSIONES**

---



1. Los genes *IFIH1* y *CLEC16A*, asociados previamente a la diabetes tipo 1, confieren susceptibilidad a las mujeres con colitis ulcerosa y a los enfermos de Crohn carentes del principal factor de susceptibilidad *NOD2*, respectivamente. Esto indica que, al igual que sucede en DT1, el proceso de reconocimiento de patógenos está implicado en la etiología de la EII.
2. Los genes *ATG16L1* e *IRGM* son factores de susceptibilidad específicos de la enfermedad de Crohn. Nuestro estudio corrobora la implicación del proceso de autofagia en esta patología.
3. Replicamos la asociación de la región 3p21, que incluye al gen *MST1*, con la enfermedad de Crohn, pero no con la colitis ulcerosa. Nuestros datos sugieren que esta asociación sea específica de los enfermos con la forma ileal de la enfermedad.
4. Describimos por primera vez la asociación de *IL2* con la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. No encontramos asociación de los polimorfismos analizados en los genes del receptor *IL2RA*, recientemente asociado a la EC, e *IL2RB*.
5. Nuestro estudio confirma la asociación de *IL23R* e *IL12B* con la enfermedad inflamatoria intestinal. Sin embargo, no detectamos la interacción entre ambos genes descrita anteriormente en psoriasis.
6. Replicamos, en una población independiente, la asociación del gen *NKX2-3* con la enfermedad inflamatoria intestinal, previamente detectada mediante barrido genómico.
7. El polimorfismo -25385 C/T, localizado en el promotor del gen *PXR*, confiere susceptibilidad a la forma extensa de la colitis ulcerosa. Este efecto depende del genotipo presente en un polimorfismo del gen *MDR1*.
8. Describimos por primera vez la asociación del gen *STAT4*, común a numerosas enfermedades autoinmunes, con la enfermedad inflamatoria intestinal.
9. La región 17q21, que contiene al gen *STAT3*, muestra asociación con ambas formas

## *Conclusiones*

---

clínicas de la EII en la población española, presentando dos señales independientes, una señal de susceptibilidad para la enfermedad de Crohn y otra para la colitis ulcerosa.

## **6. PERSPECTIVAS**

---





Desde que comenzó a estudiarse el componente genético de la enfermedad inflamatoria intestinal, primero mediante estudios de ligamiento en familias, más tarde a través de estudios de asociación de genes candidatos y, en los últimos años, mediante estudios a gran escala analizando cientos de miles de polimorfismos a lo largo de todo el genoma, se han encontrado numerosos genes implicados en la patología. Sin embargo, los factores genéticos identificados hasta la fecha sólo suponen un pequeño porcentaje del componente hereditario de la misma. Uno de nuestros objetivos en este trabajo ha sido el descubrimiento de nuevos genes de susceptibilidad a la enfermedad inflamatoria intestinal, profundizando en el análisis de asociaciones en subgrupos específicos y de interacciones gen-gen, que con toda probabilidad desempeñan un importante papel en la etiología de las enfermedades complejas. Los genes incluidos en este trabajo se han seleccionado en base a tres criterios: por la función que desempeñan, por su implicación en otras enfermedades autoinmunes y por su asociación previa a la EII en otras poblaciones.

Como ha quedado patente en este trabajo, las diferencias existentes entre las distintas poblaciones llevan en muchas ocasiones a resultados contradictorios entre estudios. Por ello, otro de nuestros propósitos ha sido la replicación de resultados observados en poblaciones de distinto origen, fundamentalmente considerando que los estudios que se están llevando a cabo en la actualidad se basan en una estrategia indirecta, en la que la mayor parte de las señales detectadas se deben a meros marcadores genéticos. La replicación de asociaciones anteriormente descubiertas, mediante estudios de asociación en genes candidatos o de barrido genómico, nos parece de gran interés, ya que, la validación de estos resultados en poblaciones independientes es el primer paso para demostrar que se trata de una verdadera asociación y no de un encuentro casual. Por otro lado, como ya se ha comentado, el desequilibrio de ligamiento puede variar entre diferentes poblaciones, de manera que la replicación de una asociación previa puede indicar que se trata del SNP causal y no de un marcador genético. Además, como ya se ha comentado, los estudios de barrido genómico presentan una serie de limitaciones, como su estricto umbral de significación o la ausencia de análisis estratificados que, en muchos casos, dan lugar a la aparición de resultados falsos negativos y a la falta de detección de señales existentes.

Nuestros estudios, entre otros, han colaborado al establecimiento de unos 30 “loci” de susceptibilidad a la EC y otros tantos a la CU. Como hemos podido observar, algunos de los genes implicados, como *ATG16L1* e *IRGM* o *IL23R*, *STAT3* y *STAT4*, participan en rutas moleculares comunes, lo que ha ayudado a profundizar en el conocimiento de la etiología de la

EII. Además, muchos de estos genes son comunes a diferentes enfermedades autoinmunes, las cuales parecen compartir algunos de los mecanismos moleculares implicados en su patogenia.

Actualmente, se están desarrollando proyectos internacionales que tienen como finalidad el análisis de variantes raras cuya contribución a la etiología de las enfermedades complejas no está recogida en los actuales estudios de barrido genómico. El siguiente paso a seguir dentro de esta gran explosión en el conocimiento del componente genético de la enfermedad inflamatoria intestinal, será el descubrimiento de las variantes etiológicas verdaderamente implicadas y de los mecanismos moleculares a través de los cuales participan en la patología.

## **7. REFERENCIAS**

---



1. García-Paredes J, Mendoza J. Epidemiología descriptiva de la enfermedad inflamatoria intestinal en España. *An Med Interna*. 2003(20):1-2.
2. Brant SR, Nguyen GC. Is there a gender difference in the prevalence of Crohn's disease or ulcerative colitis? *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Oct;14 Suppl 2:S2-3.
3. Rich R, Fleisher TA, Shearer WT, et al. *Clinical Immunology*. 2001;Vol. II:87.10-87.15.
4. Rose NR, Mackay IR. *The Autoimmune Diseases*. 2006. Cuarta edición;Vol. 52:713-28.
5. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*. 2005 Sep;19 Suppl A:5-36.
6. Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jun;8(6):411-20.
7. Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jun;8(6):458-66.
8. Magalhaes JG, Tattoli I, Girardin SE. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol*. 2007 Apr;19(2):106-15.
9. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev*. 2005 Aug;206:232-59.
10. Lee J, Mo JH, Katakura K, et al. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol*. 2006 Dec;8(12):1327-36.
11. Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, et al. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. *Science*. 2000 Sep 1;289(5484):1560-3.
12. Sartor RB. The influence of normal microbial flora on the development of chronic mucosal inflammation. *Res Immunol*. 1997 Oct-Dec;148(8-9):567-76.
13. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, et al. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*. 2005 Jul 15;122(1):107-18.
14. Hermiston ML, Gordon JI. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science*. 1995 Nov 17;270(5239):1203-7.
15. Pullan RD, Thomas GA, Rhodes M, et al. Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut*. 1994 Mar;35(3):353-9.

16. Soderholm JD, Olaison G, Peterson KH, et al. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut*. 2002 Mar;50(3):307-13.
17. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* . 2000 Dec;68(12):7010-7.
18. Wald D, Qin J, Zhao Z, et al. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol*. 2003 Sep;4(9):920-7.
19. Dubuquoy L, Jansson EA, Deeb S, et al. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2003 May;124(5):1265-76.
20. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):599-603.
21. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):603-6.
22. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2005 Jul;129(1):50-65.
23. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(7):521-33.
24. Yen D, Cheung J, Scheerens H, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*. 2006 May;116(5):1310-6.
25. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993 Oct 22;75(2):263-74.
26. Kraus TA, Toy L, Chan L, et al. Failure to induce oral tolerance in Crohn's and ulcerative colitis patients: possible genetic risk. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Dec;1029:225-38.
27. Kraus TA, Toy L, Chan L, et al. Failure to induce oral tolerance to a soluble protein in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2004 Jun;126(7):1771-8.
28. Gent AE, Hellier MD, Grace RH, et al. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet*. 1994 Mar 26;343(8900):766-7.
29. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence,

and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004 May;126(6):1504-17.

30. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, et al. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2006 Jun 21;12(23):3668-72.

31. Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, et al. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology*. 2003;124(7):1767-73.

32. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 2007 May 12;369(9573):1627-40.

33. Adeyemo A, Rotimi C. Genetic variants associated with complex human diseases show wide variation across multiple populations. *Public Health Genomics*. 2010;13(2):72-9.

34. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature*. 1996;379(6568):821-3.

35. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem*. 2003 Feb 21;278(8):5509-12.

36. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*. 2005 Feb 4;307(5710):731-4.

37. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, et al. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol*. 2004 Dec;99(12):2393-404.

38. van der Linde K, Kuipers EJ, de Rooij FW, et al. [From gene to disease; 'frame shift'-mutation in the CARD15-gene and Crohn's disease]. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2002 Dec 28;146(52):2539-42.

39. Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, et al. Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *J Hum Genet*. 2002;47(9):469-72.

40. Abraham C, Cho JH. Functional consequences of NOD2 (CARD15) mutations. *Inflamm Bowel Dis*. 2006 Jul;12(7):641-50.

41. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut*. 1998 Apr;42(4):477-84.



42. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, et al. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol*. 2004 Aug;5(8):800-8.
43. Ahmad T, Marshall SE, Jewell D. Genetics of inflammatory bowel disease: the role of the HLA complex. *World J Gastroenterol*. 2006 Jun 21;12(23):3628-35.
44. Stokkers PC, Reitsma PH, Tytgat GN, et al. HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut*. 1999 Sep;45(3):395-401.
45. Gomez-Garcia M, Oliver J, Marquez A, et al. Strong protective effect of DR3 against ulcerative colitis in the Spanish population. *Am J Gastroenterol*. 2007 Dec;102(12):2762-6.
46. Fernandez L, Mendoza JL, Martinez A, et al. IBD1 and IBD3 determine location of Crohn's disease in the Spanish population. *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10(6):715-22.
47. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;122(4):854-66.
48. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, et al. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet*. 2004;36(5):471-5.
49. Yamazaki K, McGovern D, Ragoussis J, et al. Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. *Hum Mol Genet*. 2005 Nov 15;14(22):3499-506.
50. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007 Jun 7;447(7145):661-78.
51. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006 Dec 1;314(5804):1461-3.
52. Franke A, Fischer A, Nothnagel M, et al. Genome-wide association analysis in sarcoidosis and Crohn's disease unravels a common susceptibility locus on 10p12.2. *Gastroenterology*. 2008 Oct;135(4):1207-15.
53. Franke A, Hampe J, Rosenstiel P, et al. Systematic association mapping identifies NELL1 as a novel IBD disease gene. *PLoS One*. 2007;2(1):e691.
54. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*. 2007 Feb;39(2):207-11.

- 
55. Libioulle C, Louis E, Hansoul S, et al. Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. *PLoS Genet*. 2007 Apr 20;3(4):e58.
56. Raelson JV, Little RD, Ruether A, et al. Genome-wide association study for Crohn's disease in the Quebec Founder Population identifies multiple validated disease loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 11;104(37):14747-52.
57. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet*. 2007 May;39(5):596-604.
58. Asano K, Matsushita T, Umeno J, et al. A genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for ulcerative colitis in the Japanese population. *Nat Gen et*. 2009 Dec;41(12):1325-9.
59. Barrett JC, Lee JC, Lees CW, et al. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet* . 2009 Dec;41(12):1330-4.
60. Fisher SA, Tremelling M, Anderson CA, et al. Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat Genet* . 2008 Jun;40(6):710-2.
61. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, et al. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet*. 2008 Nov;40(11):1319-23.
62. Franke A, Balschun T, Sina C, et al. Genome-wide association study for ulcerative colitis identifies risk loci at 7q22 and 22q13 (IL17REL). *Nat Genet*. 2010 Apr;42(4):292-4.
63. Silverberg MS, Cho JH, Rioux JD, et al. Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nat Genet*. 2009 Feb;41(2):216-20.
64. Imielinski M, Baldassano RN, Griffiths A, et al. Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease. *Nat Genet*. 2009 Dec;41(12):1335-40.
65. Kugathasan S, Baldassano RN, Bradfield JP, et al. Loci on 20q13 and 21q22 are associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease. *Nat Genet*. 2008 Oct;40(10):1211-5.

## Referencias

---

66. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet.* 2008 Aug;40(8):955-62.
67. Franke A, McGovern DP, Barrett JC, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010 Dec;42(12):1118-25.
68. McGovern DP, Gardet A, Torkvist L, et al. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010 Apr;42(4):332-7.
69. Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008 Jul 21;14(27):4280-8.
70. Trynka G, Zhernakova A, Romanos J, et al. Coeliac disease-associated risk variants in TNFAIP3 and REL implicate altered NF-kappaB signalling. *Gut.* 2009 Aug;58(8):1078-83.
71. Gregersen PK, Amos CI, Lee AT, et al. REL, encoding a member of the NF-kappaB family of transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2009 Jul;41(7):820-3.
72. Kabashima K, Saji T, Murata T, et al. The prostaglandin receptor EP4 suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut. *J Clin Invest.* 2002 Apr;109(7):883-93.
73. Schmehl K, Florian S, Jacobasch G, et al. Deficiency of epithelial basement membrane laminin in ulcerative colitis affected human colonic mucosa. *Int J Colorectal Dis.* 2000 Feb;15(1):39-48.
74. Bamias G, Martin C, 3rd, Marini M, et al. Expression, localization, and functional activity of TL1A, a novel Th1-polarizing cytokine in inflammatory bowel disease. *J Immunol.* 2003 Nov 1;171(9):4868-74.
75. Underhill DM, Shimada T. A pair of 9s: it's in the CARDs. *Nat Immunol.* 2007 Feb;8(2):122-4.
76. Gross O, Gewies A, Finger K, et al. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature.* 2006 Aug 10;442(7103):651-6.
77. Hsu YM, Zhang Y, You Y, et al. The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens. *Nat Immunol.* 2007 Feb;8(2):198-205.
78. LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, et al. Syk- and CARD9-dependent

- coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol.* 2007 Jun;8(6):630-8.
79. Safford M, Collins S, Lutz MA, et al. Egr-2 and Egr-3 are negative regulators of T cell activation. *Nat Immunol.* 2005 May;6(5):472-80.
80. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest.* 2008 Feb;118(2):534-44.
81. Verlaan DJ, Berlivet S, Hunninghake GM, et al. Allele-specific chromatin remodeling in the ZPBP2/GSDMB/ORMDL3 locus associated with the risk of asthma and autoimmune disease. *Am J Hum Genet.* 2009 Sep;85(3):377-93.
82. Todd DJ, Lee AH, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2008 Sep;8(9):663-74.
83. Heinonen KM, Nestel FP, Newell EW, et al. T-cell protein tyrosine phosphatase deletion results in progressive systemic inflammatory disease. *Blood.* 2004 May 1;103(9):3457-64.
84. Peters JM, Hollingshead HE, Gonzalez FJ. Role of peroxisome-proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) in gastrointestinal tract function and disease. *Clin Sci (Lond).* 2008 Aug;115(4):107-27.
85. Heath SC, Gut IG, Brennan P, et al. Investigation of the fine structure of European populations with applications to disease association studies. *Eur J Hum Genet.* 2008 Dec;16(12):1413-29.
86. Unterholzner L, Bowie AG. The interplay between viruses and innate immune signaling: recent insights and therapeutic opportunities. *Biochem Pharmacol.* 2008 Feb 1;75(3):589-602.
87. Smyth DJ, Cooper JD, Bailey R, et al. A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nat Genet.* 2006 Jun;38(6):617-9.
88. Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Engering A, et al. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:33-54.
89. Varki A, Cummings RD, Esko Jd, et al. Essentials of Glicobiology; 2009.
90. Hakonarson H, Grant SF, Bradfield JP, et al. A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. *Nature.* 2007 Aug 2;448(7153):591-4.

91. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med*. 2007 Aug 30;357(9):851-62.
92. Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, et al. Toll-like receptors control autophagy. *Embo J*. 2008 Apr 9;27(7):1110-21.
93. Xu Y, Jagannath C, Liu XD, et al. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity*. 2007 Jul;27(1):135-44.
94. Cullinane M, Gong L, Li X, et al. Stimulation of autophagy suppresses the intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei* in mammalian cell lines. *Autophagy*. 2008 Aug 16;4(6):744-53.
95. Py BF, Lipinski MM, Yuan J. Autophagy limits *Listeria monocytogenes* intracellular growth in the early phase of primary infection. *Autophagy*. 2007 Mar-Apr;3(2):117-25.
96. Yano T, Mita S, Ohmori H, et al. Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in drosophila. *Nat Immunol*. 2008 Aug;9(8):908-16.
97. Zhao Z, Fux B, Goodwin M, et al. Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens. *Cell Host Microbe*. 2008 Nov 13;4(5):458-69.
98. Harris J, De Haro SA, Master SS, et al. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity*. 2007 Sep;27(3):505-17.
99. Dengjel J, Schoor O, Fischer R, et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 May 31;102(22):7922-7.
100. Paludan C, Schmid D, Landthaler M, et al. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science*. 2005 Jan 28;307(5709):593-6.
101. Nedjic J, Aichinger M, Emmerich J, et al. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature*. 2008 Sep 18;455(7211):396-400.
102. Lunemann JD, Munz C. Autophagy in CD4+ T-cell immunity and tolerance. *Cell Death Differ*. 2009 Jan;16(1):79-86.
103. Baptista ML, Amarante H, Picheth G, et al. CARD15 and IL23R influences Crohn's disease susceptibility but not disease phenotype in a Brazilian population. *Inflamm Bowel Dis*.

2008 May;14(5):674-9.

104. Fowler EV, Doecke J, Simms LA, et al. ATG16L1 T300A shows strong associations with disease subgroups in a large Australian IBD population: further support for significant disease heterogeneity. *Am J Gastroenterol*. 2008 Oct;103(10):2519-26.

105. Glas J, Konrad A, Schmechel S, et al. The ATG16L1 gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to Crohn's disease in the German population. *Am J Gastroenterol*. 2008 Mar;103(3):682-91.

106. Lakatos PL, Szamosi T, Szilvasi A, et al. ATG16L1 and IL23 receptor (IL23R) genes are associated with disease susceptibility in Hungarian CD patients. *Dig Li ver Dis*. 2008 Nov;40(11):867-73.

107. Lappalainen M, Halme L, Turunen U, et al. Association of IL23R, TNFRSF1A, and HLA-DRB1\*0103 allele variants with inflammatory bowel disease phenotypes in the Finnish population. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Aug;14(8):1118-24.

108. Latiano A, Palmieri O, Valvano MR, et al. Replication of interleukin 23 receptor and autophagy-related 16-like 1 association in adult- and pediatric-onset inflammatory bowel disease in Italy. *World J Gastroenterol*. 2008 Aug 7;14(29):4643-51.

109. Okazaki T, Wang MH, Rawsthorne P, et al. Contributions of IBD5, IL23R, ATG16L1, and NOD2 to Crohn's disease risk in a population-based case-control study: evidence of gene-gene interactions. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Nov;14(11):1528-41.

110. Perricone C, Borgiani P, Romano S, et al. ATG16L1 Ala197Thr is not associated with susceptibility to Crohn's disease or with phenotype in an Italian population. *Gastroenterology*. 2008 Jan;134(1):368-70.

111. Roberts RL, Gearry RB, Hollis-Moffatt JE, et al. IL23R R381Q and ATG16L1 T300A are strongly associated with Crohn's disease in a study of New Zealand Caucasians with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2007 Dec;102(12):2754-61.

112. Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, et al. Autophagy gene ATG16L1 influences susceptibility and disease location but not childhood-onset in Crohn's disease in Northern Europe. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Mar;14(3):338-46.

113. Weersma RK, Zhernakova A, Nolte IM, et al. ATG16L1 and IL23R are associated with inflammatory bowel diseases but not with celiac disease in the Netherlands. *Am J*

*Gastroenterol.* 2008 Mar;103(3):621-7.

114. Singh SB, Davis AS, Taylor GA, et al. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science*. 2006 Sep 8;313(5792):1438-41.

115. Collazo CM, Yap GS, Sempowski GD, et al. Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection. *J Exp Med*. 2001 Jul 16;194(2):181-8.

116. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet*. 2007 Jul;39(7):830-2.

117. Wang MH, Zhou YQ, Chen YQ. Macrophage-stimulating protein and RON receptor tyrosine kinase: potential regulators of macrophage inflammatory activities. *Scand J Immunol*. 2002 Dec;56(6):545-53.

118. Morrison AC, Wilson CB, Ray M, et al. Macrophage-stimulating protein, the ligand for the stem cell-derived tyrosine kinase/RON receptor tyrosine kinase, inhibits IL-12 production by primary peritoneal macrophages stimulated with IFN-gamma and lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2004 Feb 1;172(3):1825-32.

119. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003 Feb;3(2):133-46.

120. Villar J, Maca-Meyer N, Perez-Mendez L, et al. Bench-to-bedside review: understanding genetic predisposition to sepsis. *Crit Care*. 2004 Jun;8(3):180-9.

121. Beckly JB, Hancock L, Geremia A, et al. Two-stage candidate gene study of chromosome 3p demonstrates an association between nonsynonymous variants in the MST1R gene and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Apr;14(4):500-7.

122. Goyette P, Lefebvre C, Ng A, et al. Gene-centric association mapping of chromosome 3p implicates MST1 in IBD pathogenesis. *Mucosal Immunol*. 2008 Mar;1(2):131-8.

123. Sadlack B, Merz H, Schorle H, et al. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*. 1993;75(2):253-61.

124. Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C, et al. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science*. 1995;268(5216):1472-6.

125. Burchill MA, Yang J, Vang KB, et al. Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunol Lett*. 2007;114(1):1-8.
126. Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S. The dichotomous role of IL-2: tolerance versus immunity. *Trends Immunol*. 2006;27(3):109-11.
127. Malek TR, Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(9):665-74.
128. Nelson BH. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J Immunol*. 2004;172(7):3983-8.
129. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*. 2007;26(3):371-81.
130. O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2002 Jan;2(1):37-45.
131. van Heel DA, Franke L, Hunt KA, et al. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet*. 2007;39(7):827-9. Epub 2007 Jun 10.
132. Kikly K, Liu L, Na S, et al. The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol*. 2006 Dec;18(6):670-5.
133. Becker C, Wirtz S, Blessing M, et al. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest*. 2003 Sep;112(5):693-706.
134. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell*. 2006 Sep 22;126(6):1121-33.
135. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):231-4.
136. Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, et al. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology*. 2000 Jun;118(6):1001-11.
137. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003 Feb 13;421(6924):744-8.
138. Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue



inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1133-41.

139. Schmidt C, Giese T, Ludwig B, et al. Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2005 Jan;11(1):16-23.

140. Maloy KJ. The Interleukin-23 / Interleukin-17 axis in intestinal inflammation. *J Intern Med*. 2008 Jun;263(6):584-90.

141. Seegers D, Zwiers A, Strober W, et al. A TaqI polymorphism in the 3'UTR of the IL-12 p40 gene correlates with increased IL-12 secretion. *Genes Immun*. 2002 Nov;3(7):419-23.

142. Pabst O, Zweigerdt R, Arnold HH. Targeted disruption of the homeobox transcription factor Nkx2-3 in mice results in postnatal lethality and abnormal development of small intestine and spleen. *Development*. 1999 May;126(10):2215-25.

143. Tarlinton D, Light A, Metcalf D, et al. Architectural defects in the spleens of Nkx2-3-deficient mice are intrinsic and associated with defects in both B cell maturation and T cell-dependent immune responses. *J Immunol*. 2003 Apr 15;170(8):4002-10.

144. Esworthy RS, Aranda R, Martin MG, et al. Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001 Sep;281(3):G848-55.

145. Panwala CM, Jones JC, Viney JL. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, mdr1a, spontaneously develop colitis. *J Immunol*. 1998 Nov 15;161(10):5733-44.

146. Ho GT, Nimmo ER, Tenesa A, et al. Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2005 Feb;128(2):288-96.

147. Brant SR, Panhuysen CI, Nicolae D, et al. MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet*. 2003 Dec;73(6):1282-92.

148. Langmann T, Moehle C, Mauerer R, et al. Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes. *Gastroenterology*. 2004 Jul;127(1):26-40.

149. Zhou C, Tabb MM, Nelson EL, et al. Mutual repression between steroid and xenobiotic receptor and NF-kappaB signaling pathways links xenobiotic metabolism and inflammation. *J*

*Clin Invest.* 2006;116(8):2280-9.

150. Wahli W. A gut feeling of the PXR, PPAR and NF-kappaB connection. *J Intern Med.* 2008 Jun;263(6):613-9.

151. Dring MM, Goulding CA, Trimble VI, et al. The pregnane X receptor locus is associated with susceptibility to inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2006 Feb;130(2):341-8.

152. Ho GT, Soranzo N, Tate SK, et al. Lack of association of the pregnane X receptor (PXR/NR1I2) gene with inflammatory bowel disease: parallel allelic association study and gene wide haplotype analysis. *Gut.* 2006 Nov;55(11):1676-7.

153. Mathur AN, Chang HC, Zisoulis DG, et al. Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *J Immunol.* 2007 Apr 15;178(8):4901-7.

154. Kaplan MH. STAT4: a critical regulator of inflammation in vivo. *Immunol Rev.* 2005;31(3):231-42.

155. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2007 Sep 6;357(10):977-86.

156. Durant L, Watford WT, Ramos HL, et al. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity.* 2010 May 28;32(5):605-15.

157. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1989;170:2-6; discussion 16-9.

158. Lewontin RC. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics.* 1988 Nov;120(3):849-52.

159. Pritchard JK, Przeworski M. Linkage disequilibrium in humans: models and data. *Am J Hum Genet.* 2001 Jul;69(1):1-14.

160. Friedrichs F, Brescianini S, Annese V, et al. Evidence of transmission ratio distortion of DLG5 R30Q variant in general and implication of an association with Crohn disease in men. *Hum Genet.* 2006 Apr;119(3):305-11.

161. Lin Z, Poritz L, Franke A, et al. Genetic association of nonsynonymous variants of the IL23R with familial and sporadic inflammatory bowel disease in women. *Dig Dis Sci.* 2010 Mar;55(3):739-46.

162. Fish EN. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses.

*Nat Rev Immunol*. 2008 Sep;8(9):737-44.

163. Su L, Sun Y, Ma F, et al. Progesterone inhibits Toll-like receptor 4-mediated innate immune response in macrophages by suppressing NF-kappaB activation and enhancing SOCS1 expression. *Immunol Lett*. 2009 Aug 15;125(2):151-5.

164. Liu S, Wang H, Jin Y, et al. IFIH1 polymorphisms are significantly associated with type 1 diabetes and IFIH1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells. *Hum Mol Genet* . 2009 Jan 15;18(2):358-65.

165. Ferreira RC, Pan-Hammarstrom Q, Graham RR, et al. Association of IFIH1 and other autoimmunity risk alleles with selective IgA deficiency. *Nat Genet*. 2010 Sep;42(9):777-80.

166. Sutherland A, Davies J, Owen CJ, et al. Genomic polymorphism at the interferon-induced helicase (IFIH1) locus contributes to Graves' disease susceptibility. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Aug;92(8):3338-41.

167. Petermann I, Huebner C, Browning BL, et al. Interactions among genes influencing bacterial recognition increase IBD risk in a population-based New Zealand cohort. *Hum Immunol*. 2009 Jun;70(6):440-6.

168. Torok HP, Glas J, Endres I, et al. Epistasis between Toll-like receptor-9 polymorphisms and variants in NOD2 and IL23R modulates susceptibility to Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2009 Jul;104(7):1723-33.

169. Nunez C, Oliver J, Mendoza JL, et al. CD209 in inflammatory bowel disease: a case-control study in the Spanish population. *BMC Med Genet*. 2007;8:75.

170. Martinez A, Sanchez-Lopez M, Varade J, et al. Role of the MHC2TA gene in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis*. 2007 Mar;66(3):325-9.

171. Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, et al. A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology*. 2007 May;132(5):1665-71.

172. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature*. 2008 Oct 5.

173. Kuballa P, Huett A, Rioux JD, et al. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS ONE*. 2008;3(10):e3391.

174. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*. 2008 Oct 5.
175. Cooney R, Baker J, Brain O, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med*. 2010 Jan;16(1):90-7.
176. Homer CR, Richmond AL, Rebert NA, et al. ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology*. 2010 Nov;139(5):1630-41, 41 e1-2.
177. Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol*. 2010 Jan;11(1):55-62.
178. Yamazaki K, Onouchi Y, Takazoe M, et al. Association analysis of genetic variants in IL23R, ATG16L1 and 5p13.1 loci with Crohn's disease in Japanese patients. *J Hum Genet*. 2007;52(7):575-83.
179. McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, et al. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat Genet*. 2008 Aug 24.
180. Prescott NJ, Dominy KM, Kubo M, et al. Independent and population-specific association of risk variants at the IRGM locus with Crohn's disease. *Hum Mol Genet*. 2010 May 1;19(9):1828-39.
181. Yamazaki K, Takahashi A, Takazoe M, et al. Positive association of genetic variants in the upstream region of NKX2-3 with Crohn's disease in Japanese patients. *Gut*. 2009 Feb;58(2):228-32.
182. Satsangi J, Parkes M, Louis E, et al. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet*. 1996 Oct;14(2):199-202.
183. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, et al. Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. *Nat Genet*. 2008 Jun;40(6):713-5.
184. Todd JA, Walker NM, Cooper JD, et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2007 Jul;39(7):857-64.

185. Festen EA, Goyette P, Scott R, et al. Genetic variants in the region harbouring IL2/IL21 associated with ulcerative colitis. *Gut*. 2009 Jun;58(6):799-804.
186. Glas J, Stallhofer J, Ripke S, et al. Novel genetic risk markers for ulcerative colitis in the IL2/IL21 region are in epistasis with IL23R and suggest a common genetic background for ulcerative colitis and celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2009 Jul;104(7):1737-44.
187. Maiti AK, Kim-Howard X, Viswanathan P, et al. Confirmation of an association between rs6822844 at the IL2-IL21 region and multiple autoimmune diseases: evidence of a general susceptibility locus. *Arthritis Rheum*. 2010 Feb;62(2):323-9.
188. Lowe CE, Cooper JD, Brusko T, et al. Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2007 Sep;39(9):1074-82.
189. Shteingart S, Rapoport M, Grodzovski I, et al. Therapeutic potency of IL2-caspase 3 targeted treatment in a murine experimental model of inflammatory bowel disease. *Gut*. 2009 Jun;58(6):790-8.
190. Zwiers A, Seegers D, Heijmans R, et al. Definition of polymorphisms and haplotypes in the interleukin-12B gene: association with IL-12 production but not with Crohn's disease. *Genes Immun*. 2004 Dec;5(8):675-7.
191. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, et al. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet*. 2007 Feb;80(2):273-90.
192. de Leon AR, de la Serna JP, Santiago JL, et al. Association between idiopathic achalasia and IL23R gene. *Neurogastroenterol Motil*. 2010 Jul;22(7):734-8, e218.
193. Fischer A, Nothnagel M, Franke A, et al. Association of IBD Risk Loci with Sarcoidosis and its Acute and Chronic Subphenotypes. *Eur Respir J*. 2010 Jul 22.
194. Remmers EF, Cosan F, Kirino Y, et al. Genome-wide association study identifies variants in the MHC class I, IL10, and IL23R-IL12RB2 regions associated with Behcet's disease. *Nat Genet*. 2010 Aug;42(8):698-702.
195. Dema B, Fernandez-Arquero M, Maluenda C, et al. Lack of association of NKX2-3, IRGM, and ATG16L1 inflammatory bowel disease susceptibility variants with celiac disease. *Hum Immunol*. 2009 Nov;70(11):946-9.

196. Pabst O, Forster R, Lipp M, et al. NKX2.3 is required for MAdCAM-1 expression and homing of lymphocytes in spleen and mucosa-associated lymphoid tissue. *Embo J*. 2000 May 2;19(9):2015-23.
197. McDonald SA, Palmen MJ, Van Rees EP, et al. Characterization of the mucosal cell-mediated immune response in IL-2 knockout mice before and after the onset of colitis. *Immunology*. 1997 May;91(1):73-80.
198. Briskin M, Winsor-Hines D, Shyjan A, et al. Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *Am J Pathol*. 1997 Jul;151(1):97-110.
199. Ji JD, Lee WJ, Kong KA, et al. Association of STAT4 polymorphism with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2010 Jan;37(1):141-7.
200. Korman BD, Alba MI, Le JM, et al. Variant form of STAT4 is associated with primary Sjogren's syndrome. *Genes Immun*. 2008 Apr;9(3):267-70.
201. Watford WT, Hissong BD, Bream JH, et al. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol Rev*. 2004 Dec;202:139-56.
202. Glas J, Seiderer J, Nagy M, et al. Evidence for STAT4 as a common autoimmune gene: rs7574865 is associated with colonic Crohn's disease and early disease onset. *PLoS One*. 2010;5(4):e10373.
203. Diaz-Gallo LM, Palomino-Morales RJ, Gomez-Garcia M, et al. STAT4 gene influences genetic predisposition to ulcerative colitis but not Crohn's disease in the Spanish population: a replication study. *Hum Immunol*. 2010 May;71(5):515-9.
204. Mudter J, Weigmann B, Bartsch B, et al. Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol*. 2005 Jan;100(1):64-72.
205. Pang YH, Zheng CQ, Yang XZ, et al. Increased expression and activation of IL-12-induced Stat4 signaling in the mucosa of ulcerative colitis patients. *Cell Immunol*. 2007 Aug;248(2):115-20.
206. O'Malley JT, Eri RD, Stritesky GL, et al. STAT4 isoforms differentially regulate Th1 cytokine production and the severity of inflammatory bowel disease. *J Immunol*. 2008 Oct

1;181(7):5062-70.

207. O'Malley JT, Sehra S, Thieu VT, et al. Signal transducer and activator of transcription 4 limits the development of adaptive regulatory T cells. *Immunology*. 2009 Aug;127(4):587-95.

208. Rueda B, Broen J, Simeon C, et al. The STAT4 gene influences the genetic predisposition to systemic sclerosis phenotype. *Hum Mol Genet*. 2009 Jun 1;18(11):2071-7.

209. Zervou MI, Goulielmos GN, Castro-Giner F, et al. STAT4 gene polymorphism is associated with psoriasis in the genetically homogeneous population of Crete, Greece. *Hum Immunol*. 2009 Sep;70(9):738-41.

210. Lee HS, Park H, Yang S, et al. STAT4 polymorphism is associated with early-onset type 1 diabetes, but not with late-onset type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Dec;1150:93-8.

211. Kawasaki A, Ito I, Hikami K, et al. Role of STAT4 polymorphisms in systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study of the STAT1-STAT4 region. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(5):R113.

212. Lee HS, Remmers EF, Le JM, et al. Association of STAT4 with rheumatoid arthritis in the Korean population. *Mol Med*. 2007 Sep-Oct;13(9-10):455-60.

213. Anderson CA, Massey DC, Barrett JC, et al. Investigation of Crohn's disease risk loci in ulcerative colitis further defines their molecular relationship. *Gastroenterology*. 2009 Feb;136(2):523-9 e3.

214. Silverberg MS, Mirea L, Bull SB, et al. A population- and family-based study of Canadian families reveals association of HLA DRB1\*0103 with colonic involvement in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2003 Jan;9(1):1-9.

215. Sato K, Shiota M, Fukuda S, et al. Strong evidence of a combination polymorphism of the tyrosine kinase 2 gene and the signal transducer and activator of transcription 3 gene as a DNA-based biomarker for susceptibility to Crohn's disease in the Japanese population. *J Clin Immunol*. 2009 Nov;29(6):815-25.

216. Amre DK, Mack DR, Morgan K, et al. Susceptibility loci reported in genome-wide association studies are associated with Crohn's disease in Canadian children. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010 Jun;31(11):1186-91.

217. Sugimoto K. Role of STAT3 in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008

Sep 7;14(33):5110-4.

218. Neufert C, Pickert G, Zheng Y, et al. Activation of epithelial STAT3 regulates intestinal homeostasis. *Cell Cycle*. 2010 Feb 15;9(4):652-5.

219. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med*. 2009 Nov 19;361(21):2033-45.

220. Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, et al. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*. 1999 Jan;10(1):39-49.

221. Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, et al. Reduced intestinal inflammation induced by dextran sodium sulfate in interleukin-6-deficient mice. *Int J Mol Med*. 2004 Aug;14(2):191-6.





## **8. ANEXO: publicaciones derivadas de este trabajo**

---



- ❑ Martínez A, Márquez A, Mendoza J, et al. Role of the PXR gene locus in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2007 Dec 13(12):1484-7.
- ❑ Márquez A, Mendoza JL, Taxonera C, et al. IL23R and IL12B polymorphisms in Spanish IBD patients: no evidence of interaction. *Inflamm Bowel Dis* . 2008 Sep 14(9):1192-6.
- ❑ Martínez A, Varadé J, Márquez A, et al. Association of the STAT4 gene with increased susceptibility for some immune-mediated diseases. *Arthritis Rheum* . 2008 Sep 58(9):2598-602.
- ❑ Márquez A, Varadé J, Robledo G, et al. Specific association of a CLEC16A/KIAA0350 polymorphism with NOD2/CARD15(-) Crohn's disease patients. *Eur J Hum Genet*. 2009 Oct 17(10):1304-8.
- ❑ Márquez A, Orozco G, Martínez A, et al. Novel association of the interleukin 2-interleukin 21 region with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2009 Aug 104(8):1968-75.
- ❑ Márquez A, Núñez C, Martínez A, et al. Role of ATG16L1 Thr300Ala polymorphism in inflammatory bowel disease: a Study in the Spanish population and a meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Nov 15(11):1697-704.
- ❑ Márquez A, Cénit MC, Núñez C, et al. Effect of BSN-MST1 locus on inflammatory bowel disease and multiple sclerosis susceptibility. *Genes Immun*. 2009 Oct 10(7):631-5.
- ❑ Cénit MC, Alcina A, Márquez A, et al. STAT3 locus in inflammatory bowel disease and multiple sclerosis susceptibility. *Genes Immun*. 2010 Apr 11(3):264-8.





